

**ZUR ISOLIERUNG VON
ZWEI OBERFLÄCHENPROTEINEN AUS
PLASMODIUM FALCIPARUM MEROZOITEN.
IMMUNOLOGISCHE CHARAKTERISIERUNG
DES 83.000 Da UND DES 43.000 Da ANTIGENS**

vorgelegt von
Arja Miettinen-Baumann

Disbui. München

1987



ZUR ISOLIERUNG VON ZWEI OBERFLÄCHENPROTEINEN
AUS *PLASMODIUM FALCIPARUM* MEROZOITEN. IMMUNOLOGISCHE
CHARAKTERISIERUNG DES 83.000 Da UND DES 43.000 Da ANTIGENS

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades des
Fachbereichs der Biologie der
Ludwig-Maximilians-Universität, München

Vorgelegt von
Arja Miettinen-Baumann
München, 1987

Die vorliegende Arbeit wurde am Max-Planck-Institut für Biochemie, Martinsried, durchgeführt.

Bei Prof. Dr. Kurt Hannig bedanke ich mich für die Bereitstellung des Arbeitsplatzes und für die guten Arbeitsbedingungen.

Herrn Dr. H.-G. Heidrich möchte ich für die Bereitstellung des Themas sowie für sein stetes Interesse und seiner freundlichen Unterstützung danken.

Herrn Prof. Dr. H. Cleve danke ich herzlich für die Vertretung dieser Arbeit an der Ludwig-Maximilians-Universität, München.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Dr. Werner Strych für seine freundschaftliche Zusammenarbeit und für seine stete Hilfsbereitschaft.

Ferner danke ich allen Mitarbeitern der Arbeitsgruppe für ihre Hilfe.



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41554616_0038

Erstgutachter: Prof. Dr. Cleve

Zweitgutachter: Prof. Dr. Bohn

Sondergutachter: Prof. Dr. Hannig

Tag der mündlichen Prüfung: 12. 8. 1987

A.	EINLEITUNG	5
B.	MATERIAL	13
B.1.	Chemikalien	13
B.2.	Medien und Pufferlösungen	15
C.	METHODEN	17
1)	Kulturen	17
2)	Anreicherung und Synchronisierung der Parasiten	17
3)	Metabolische Markierung der Parasiten und Isolierung der Merozoiten	18
4)	Jodierung der Oberflächenproteine	19
5)	Extraktion der Merozoiten-Proteine	19
6)	Gelchromatographie	20
7)	Ionenaustausch-Chromatographie	20
8)	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) und Vorbereitung der Proben für die SDS-PAGE	21
9)	Kontrollierter limitierter Protease-Abbau in der zweiten Dimension einer SDS-Gelelektrophorese	21
10)	Elektro-Elution	22
11)	Immunologische Methoden	22
11.1)	Immunisierung	22
11.2)	Isolierung von Immunglobulinen	23
11.3)	Immunelektrophorese	23
11.4)	Affinitätschromatographie	24
11.4.1)	Kopplung von IgG an die CNBr-aktivierte Sephrose Cl-4B bzw. an Eupergit C	24
11.4.2)	Affinitätschromatographische Trennung von Merozoiten-Proteinen	24
11.5)	Immunoblot	25
11.6)	Immunpräzipitation	26
11.7)	Indirekte Immunfluoreszenz-Test (IFA)	27
11.8)	In-vitro Inhibitions- und Toxizitäts-Test (IT-Test)	27
12)	Elektronenmikroskopische Untersuchungen	28
a)	Zur Überprüfung der Reinheit	28
b)	Immunelektronenmikroskopie (IEM)	29

D.	ERGEBNISSE	30
1)	Reinheit der Merozoiten	30
2)	Extraktion der Merozoiten-Proteine und Identifizierung der für die humorale Immunität relevanten Antigene	32
3)	Gelchromatographische Trennung der Merozoiten- Proteine	34
4)	Ionenaustausch-Chromatographie	36
5)	Elektro-Elution des 43 kDa-Proteins	38
6)	Immun-Reaktivität der 83- und 43 kDa-Proteine und die Gewinnung von polyvalenten Antiseren gegen die Proteine	39
7)	Reinheit von Anti-83, gezeigt durch limitierte Proteolyse in der SDS-PAGE	42
8)	Affinitätschromatographische Isolierung von 83 kDa-Protein	44
9)	Affinitätschromatographische Isolierung des 43 kDa-Proteins	45
10)	Synthesezeitpunkt der 83- bzw. 43 kDa-Proteine; Identifizierung des Vorläuferproteins für das 83 kDa Molekül	48
11)	Lokalisation der 83- bzw. 43 kDa-Proteine auf der Oberfläche der Merozoiten	52
11.a)	durch Immunoblot von ¹²⁵ J-markierten Merozoiten-Proteinen	52
11.b)	durch indirekte Immunfluoreszenz (IFA)	53
11.c)	durch Immunelektronenmikroskopie (IEM)	54
12)	Die Beteiligung der 83-bzw. 43 kDa-Proteine am Invasionsprozeß	55
E.	DISKUSSION	58
F.	ZUSAMMENFASSUNG	74
G.	LITERATUR	77

A. EINLEITUNG

Auch heute stellt die Malaria für die Weltbevölkerung eine der weitverbreitetsten und ernsthaftesten infektiösen Krankheiten dar. Jährlich werden ungefähr 200 Millionen Menschen von den Erregern der menschlichen Malaria (*Plasmodium falciparum*, *P. vivax*, *P. ovale*, *P. malariae*) infiziert, wobei etwa zwei Millionen dieser Infektionen einen tödlichen Verlauf nehmen. Die meisten der Todesfälle werden durch *P. falciparum*, den Erreger der Malaria tropica, verursacht.

Bis ins 19. Jahrhundert war herrschende Meinung, daß die Krankheit durch verseuchte 'schlechte' Luft hervorgerufen werde, die ihre Ursache in verwesenden, verfaulenden organischen Materialien in Sumpfgebieten hätte. Hieraus erklärt sich auch der Name 'Malaria' (Mala-aria = ital. schlechte Luft). Die eigentliche Krankheitsursache wurde erst 1880 von Laveran entdeckt, der das Blut infizierter französischer Soldaten untersuchte und verschiedene Färbemethoden für die morphologischen Untersuchungen der Parasiten entwickelte (Laveran, 1880). Kurz danach wurden Malaria-Parasiten auch in Vögeln, Eidechsen, Affen und anderen Säugetieren nachgewiesen.

Die Plasmodien gehören zu der Familie der *Haemosporidae*, das sind Protozoen, die in Vertebraten parasitieren und Mosquitos als Zwischenwirt benützen. Die Entwicklung der Parasiten selbst erfolgt in einem Zyklus von ungeschlechtlicher und geschlechtlicher Vermehrung. Im Menschen beginnt der Zyklus mit der Übertragung von Sporozoiten ins Blut, hervorgerufen durch Stich einer infizierten weiblichen Mücke (Gattung *Anopheles*). Spätestens nach 1-2 Stunden haben alle Sporozoiten die Leber erreicht, wo sie in die Hepatozyten eindringen und danach im Blut nicht mehr nachweisbar sind. Der Sporozoit wird vielkernig und es entwickeln sich aus einem Sporozoiten in ca. 10 Tagen bis zu 20.000 Merozoiten,

die in die Blutbahn freigesetzt werden. Zielzellen dieser Merozoiten sind die roten Blutkörperchen, deren Invasion den Anfang des erythrozytären Zyklus darstellen.

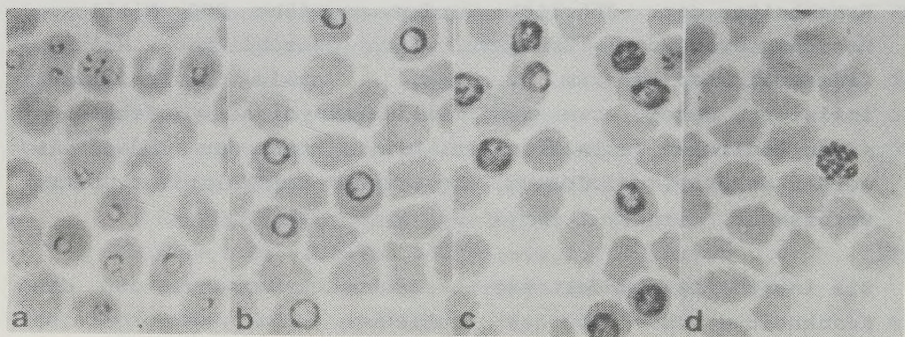


Abb. 1. Verschiedene intraerythrocytäre Stadien von *Plasmodium falciparum* (Giemsa-gefärbte Kulturausstriche). a: Ringe, b: Trophozoiten, c: Schizonten, d: Segmenter. Vergrößerung: 2000 fach.

In den Erythrozyten entwickeln sich bei *P. falciparum*, *P. vivax*, *P. ovale* innerhalb von 48 Stunden und bei *P. malariae* innerhalb von 72 h über verschiedene erythrozytäre Stadien (Ringe, Trophozoiten, Schizonten, Segmenter, s. Abb. 1) aus einem eindringenden Merozoiten erneut 16-32 Merozoiten, die nach dem Zerfall der Wirtszellen neue Erythrozyten invadieren. Ein kleiner Teil dieser Parasiten entwickelt sich in einem Zeitraum von etwa 10 Tagen zu Sexualformen (Gametozyten), die während der Blutmahlzeit einer Mücke in den Zwischenwirt zurückgelangen. Im Darmtrakt der Mücke verschmelzen reife Mikro- und Makrogameten zu einer Zygote und die gebildete Oozyste haftet sich an der Darmwand der *Anopheles* an. Innerhalb von 7-12 Tagen entwickeln sich in einer Oozyste tausende von Sporozoiten (Sinden, 1984), die sich nach Freiwerden über die Haemolymph der Mücke in ihrer Speicheldrüse sammeln. Beim erneuten Stich gelangen

Sporozoiten wieder ins Blut des Menschen.

Die klinischen Symptome der Malaria (Übelkeit, Kopfschmerzen, hohes Fieber, Anämie, Nekrose der Niere, Splenomegalie) werden durch die Vermehrung der asexuellen Stadien in den Erythrozyten, durch deren Zerstörung und durch Freigabe von pyrogenen Stoffen hervorgerufen, was zu einer Überforderung des Immunsystems führt. Zusätzlich besitzen *P. falciparum* Parasiten die Fähigkeit, durch Sequestration und Zytoadhäsion in zentralen Kapillaren der Immunabwehr zu entgehen.

Eine Überforderung des menschlichen Immunsystems durch Malaria-Infektionen (besonders bei *P. falciparum*) manifestiert sich auch auf der Ebene der Populationsgenetik. Anormale genetische Varianten von erythrozytären Proteinen, die im Normalfall für ihren Träger nachteilig wirken, sind in Populationen, die einer massiven Malaria-Bedrohung ausgesetzt sind sehr verbreitet. Zu diesen, als angeborene Resistenzen bekannten Veränderungen, gehören Sichelzellenanämie, Thalassämie und Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase-Mangel.

Anfang der 50er Jahre wurde von der WHO eine großflächige Kampagne gegen die Malaria gestartet mit dem Ziel der Ausrottung dieser Infektionskrankheit. Der Vektor *Anopheles* wurde mit Insektiziden (z.B. DDT) und parallel dazu die Parasiten im Menschen mit chemotherapeutischen Mitteln (z.B. Chloroquin) bekämpft. Die anfangs erfolgreiche Kampagne endete jedoch in einer Sackgasse. Die Mücken wurden resistent gegen die Insektizide, und die Chemotherapeutika waren wegen immer häufigeren Resistenzbildung wirkungslos gegen die Parasiten. Seit Anfang der 70er Jahre liegt der Schwerpunkt im Kampf gegen die Malaria in der Entwicklung eines Impfstoffes gegen diese Krankheit. Die Strategie, die von der WHO unterstützt wird, besteht darin, Parasitenantigene, die eine Immunantwort hervorrufen können, zu identifizieren, zu isolieren und zunächst im Tiermodell zu

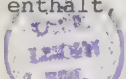
testen, ob sie zur Ausbildung einer induzierten protektiven Immunität fähig sind.

Eine natürliche Immunität gegen Malaria existiert, entwickelt sich aber nur sehr langsam und unvollständig. Wiederholte Infektionen sind notwendig, um einen gewissen Schutz zu erhalten. Dabei sind Kinder im Alter zwischen 6 Monaten und 5 Jahre am gefährdetsten (Allison und Equi, 1983). Die Ursache dafür liegt in der großen Zahl von Antigen-Varianten der infizierenden Stämme und in der fehlenden Kreuzreaktivität der gebildeten Immunglobuline gegen art-, stamm- oder stadienfremde Antigene (Nussenzweig et al., 1972b; Clyde et al., 1973; Richards et al., 1977). Die Ausbildung einer natürlichen Immunität gegen die Malaria gibt allerdings guten Grund zu der Annahme, daß die erfolgreiche Entwicklung einer Immunprophylaxe gegen die Malaria möglich sein sollte. Für einen Antikörper-Angriff bei einer aktiven Immunisierung, d.h. auch für die Entwicklung eines Impfstoffes kommen grundsätzlich Parasitenstadien in Frage, die sich zumindest vorübergehend frei, ohne die schützende Wirtszelle, im Blut befinden. Diese sind die Sporozoiten, die Gametozyten und die Merozoiten. Weiterhin müssen aber auch parasitierte Erythrozyten berücksichtigt werden, die plasmodiale Antigene auf ihre Oberfläche tragen. Aus diesen verschiedenen Stadien sind bisher immunogene Proteine identifiziert worden, die entweder gentechnologisch über rekombinierte DNA, oder affinitätschromatographisch, mit Hilfe von mono- bzw. polyklonalen Antikörpern, in relativ kleinen Mengen isoliert worden sind. Die intensivste und erfolgversprechendste Forschung auf dem Gebiet von Malaria-Antigenen wurde an dem Oberflächenprotein der Sporozoiten durchgeführt (Nussenzweig und Nussenzweig, 1986). Am wenigsten liegen Informationen über die Antigene der Gametozyten vor (Vermeulen et al., 1986).

Im Gegensatz zu den Sporozoiten und auch den Gametozyten ist das Antigenmuster der asexuellen Blutstadien erheblich

komplexer, d.h. die Entwicklung eines Impfstoffes gegen diese Stadien ist wahrscheinlich noch schwieriger. Sowohl die intraerythrozytären Formen (Trophozoiten, Schizonten) als auch die Merozoiten besitzen stadienspezifische Proteine (Kilejian, 1980; Perrin et al., 1981; Brown et al., 1982; Deans et al., 1983). Zusätzlich werden neue Komponenten, die von den Parasiten stammen, in die Oberfläche des infizierten Erythrozyten eingebaut (Eaton, 1938; Brown und Brown, 1965; Kilejian, 1979; Aley et al., 1984; Vernot-Hernandez und Heidrich, 1985; Stanley und Reese, 1986). Untersuchungen mit Immunseren von Bewohnern endemischer Gebiete zeigen, daß viele dieser Proteine als mögliche Kandidaten für eine Vakzinherstellung in Frage kommen können, denn ein Großteil der Antigene aus den Schizonten- und Merozoitenstadien reagiert mit diesen Seren (Perrin et al., 1981; Brown et al., 1982; Holder und Freeman, 1982; Heidrich et al., 1983). Die bisher untersuchten Antigene der asexuellen Blutstadien kann man grob in drei Gruppen einteilen: 1) Schizonten- und Merozoitenproteine, wobei bei den Merozoiten besonders die Oberflächenproteine wichtig sind, 2) Erythrozyten-Oberflächenproteine und 3) lösliche Proteine aus humanem Serum und aus Kulturüberständen.

Ein zu der Gruppe 1) gehörendes Molekül ist das Schizontenspezifische Glykoprotein mit dem Molekulargewicht von 190-195.000 Da (P190/195) aus *P. falciparum* (Holder und Freeman, 1982; Hall et al., 1983). Während der Differenzierung der Schizonten zu Merozoiten findet ein 'processing' des Moleküls statt, und mehrere niedermolekulare Produkte - alle vom 190-195.000 Da Vorläufer stammend - lassen sich anschließend in den Merozoiten nachweisen (Freeman und Holder, 1983; Hall et al., 1984; Holder und Freeman, 1982, 1984). Monoklonale Antikörper, die gegen die Processing-Produkte gerichtet sind, sind in der Lage, die Invasion und die Entwicklung von *P. falciparum* in vitro zu hemmen. Das Gen für P190/195 wurde in *E. coli* exprimiert (Odink et al., 1984). Die Primärstruktur des kompletten Proteins ergab (Holder et al., 1985; Hall et al., 1984), daß es mehrfach wiederholende Tripeptide enthält, die jedoch in verschiede-



nen Klonen eines Stammes variieren. Die Funktion des 190/195 kDa-Proteins ist nicht bekannt, doch könnten die Processing-Produkte beim Invasionsmechanismus eine Rolle spielen.

Eine zweite Gruppe von Merozoiten-Antigenen, die wahrscheinlich beim Invasionsprozeß mit Erythrozyten-Rezeptoren reagieren, stammt aus der Matrix der Merozoiten. Beim Invasionsprozeß richtet sich der Merozoit mit seinem apikalen Ende zum Erythrozyten, anschließend wird eine Verbindung zwischen den beiden Zellen hergestellt (Aikawa et al., 1978). Am apikalen Ende des Merozoiten befinden sich paarweise angeordnete Organellen, sog. Rhoptrien, die während der Invasion Substanzen freisetzen, über deren Zusammensetzung noch keine Klarheit besteht. Mit Hilfe mono- und polyklonaler Antikörper können in den Rhoptrien Proteine von Molekulargewichten 90 kDa, 68 kDa und 41 kDa nachgewiesen werden. Eine Immunisierung von Affen mit dem 41 kDa-Protein, das aus Gesamtmerozoiten-Extrakt isoliert wurde, erbrachte einen hohen Antikörpertiter (Perrin et al., 1985). Die Invasion der Parasiten war reduziert. Ein anderes Protein, das während der Invasion der Erythrozyten möglicherweise aus der Austritts-Öffnung der Rhoptrien frei wird (Brown et al., 1985), ist das RESA (ring-infected erythrocyte surface antigen). In Merozoiten wurde es in kleinen Organellen, den sog. Micronemen, nachgewiesen (Collins et al., 1986), die ebenso während der Invasion eine apikale Lage einnehmen. Später kann das Molekül auf der Oberfläche der ring-infizierten Erythrozyten lokalisiert werden. Antikörper gegen RESA inhibieren das Parasitenwachstum in vitro (Brown et al., 1985; Berzins et al., 1986), in vivo-Experimente mit Fusionspeptiden aus *E. coli*-Expressionssystem waren teilweise erfolgreich (Collins et al., 1986).

Dies sind einige Beispiele von Malaria-Antigenen, die im Labor in kleinen Mengen zu meist analytischen Zwecken isoliert wurden. Für Vakzinierungs-Experimente im Tiermodell und später am Menschen, sind jedoch große Mengen an

gereinigten Antigenen notwendig. Dies gelingt heute, wie im Falle von Sporozoiten-Oberflächen-Protein (Godson et al., 1983; Enea et al., 1984; Dame et al., 1984; McCutchan et al., 1984), P190/195 (Odink et al., 1984; Hall et al., 1984; Cheung et al., 1985), RESA (Cowman et al., 1985) fast ausschließlich durch gentechnologische und peptidsynthetische Verfahren. Die Gründe dafür sind einerseits die gute Ausbeute und Reinheit des gentechnologisch oder synthetisch hergestellten Materials, andererseits die Schwierigkeiten, die mit der in vitro Bereitstellung von ausreichenden Mengen an synchronem Kulturmateriail für Antigenisolierungen verbunden sind. Das aus der Kultur isolierte Antigenmaterial hat aber einen entscheidenden Vorteil gegenüber dem gentechnologisch hergestellten. Es ist, wenn die Isolierungsmethoden es erlauben, nativ, d.h. es hat die Struktur, die Größe und das Verhalten eines vollständigen nativen Moleküls. Gentechnologisch synthetisierte Proteine sind häufig Fusionsprodukte von β -Galaktosidase. Daher ist es möglich, daß wichtige immunogene Bereiche am N-terminalen Ende nicht zur Expression kommen. Bei hochmolekularen Proteinen werden nur Teilbereiche des Moleküls exprimiert, die eine veränderte Immunogenität, verglichen mit dem Gesamtmolekül, zeigen. Zusätzlich kann die Tertiärstruktur des Moleküls aufgrund der, in bakteriellen Expressionssystemen fehlenden, posttranslationalen Modifikationen, von der das nativen Moleküls abweichen. Daher erscheint die Aufgabe, native Malaria-Antigene aus in vitro kultivierten Parasiten zu isolieren, unumgänglich. Ziel der Arbeit war es daher,

- 1) immunologisch relevante Antigene in den Merozoiten von *P. falciparum*-Stamm FCB1 zu identifizieren,
- 2) mit Hilfe von biochemischen Trennverfahren zu isolieren,
- 3) Antikörper gegen diese herzustellen und mit diesen Antikörpern

- 4) die zelluläre Lokalisation der Moleküle zu identifizieren,
- 5) den genauen Syntheszeitpunkt der Proteine bzw. des Vorläufers zu erfassen und schließlich
- 6) in in vitro Inaktivierungs-Experimenten eventuell Aussagen zur Funktion der Proteine zu liefern.

Als Isolierungsziel wurde das 83 kDa Processing-Produkt des P190/195 gewählt, das als vielversprechender Kandidat für die Vakzinierung schon von anderen Autoren diskutiert, über dessen native Isolierung aber von keiner Arbeitsgruppe berichtet worden ist. Weiterhin wurde gegen ein 43 kDa-Protein, das durch Elektro-Elution nach SDS-PAGE isoliert wurde, Antikörper hergestellt. Mit diesen, gegen ein denaturiertes Protein gerichteten Immunglobulinen, sollte ebenso der oben genannten Zielsetzung folgend (s. Punkte 3-6), eine Antigencharakterisierung vorgenommen werden.

B. MATERIAL

B.1. Chemikalien

Mit Ausnahme der unten angegebenen Chemikalien wurden sie von MERCK, Darmstadt bezogen. Sie waren von p. A. Qualität.

SIGMA, USA

N-2 Hydroxyäthylpiperazin-N-2 äthansulfonsäure (HEPES)
 Natriumbikarbonat
 Gentamycin
 Antipain
 Bestatin
 Pepstatin
 Triäthanolamin
 Polyoxyäthylensorbitan Monolaurat (Tween 20)
 Albumin, Rind, Fraktion V (BSA)
 Hydroxymercurobenzoat (PCMB)
 Octyl Phenoxyl Polyäthoxyäthanol (Triton X-100)
 Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF)
 5-Brom-4-Chlor-3-Indonyl-Phosphat
 2-Amino-2-Methyl-1,3-Propandiol
 4-Chlor-1-Naphtol

SERVA, Heidelberg

N,N,N',N'-Tetramethyl-äthylendiamin (TMED)
 N',N'-Methylenbisacrylamid
 Comassie Brilliant Blue (CBB R 250)

NEW ENGLAND NUCLEAR (NEN)

³H-Hypoxanthin
³⁵S-Methionin
 Enlightning

AMERSHAM, Braunschweig

Natrium ¹²⁵I-Jodid (Na ¹²⁵I)
¹²⁵I-PROTEIN A
¹²⁵I-PROTEIN G

BEHRINGWERKE, Marburg

Freund'sches komplettes Adjuvans
 Freund'sches inkomplettes Adjuvans
 FITC-konjugierter Ziegen-anti-Kaninchen-IgG

MILES, USA

Staphylococcus aureus Protease V8

DAKOPATTS, Dänemark

Peroxidase-konjugierter Ziegen-anti-Kaninchen-IgG
Alkalische Phosphatase-konjugierter Schwein-anti-Kaninchen-IgG
Kaninchen-anti-Human-Erythrozyten-Membran-IgG
Ziegen-anti-Kaninchen-IgG
Ziegen-anti-Kaninchen-Gesamt-Serum

FLUKA AG, Schweiz

Äthylenphenyläthylenglykol (NP-40)
Kakodylsäure, Natriumsalz (Na-Kakodylat)

ROTH, Karlsruhe

2-Mercaptoäthanol
Rotizint 22

J.T. BAKER CHEMICALS, USA

Glycerin
Dimethylsulfoxid (DMSO)

BIO-RAD, USA

Natrium Dodecyl Sulfat (SDS)

BAYER, Leverkusen

Aprotinin (Trasylol)

JANSSEN, BELGIEN

Protein-A-Gold

BOEHRINGER, Mannheim

Laktoperoxidase
Glucoseoxidase
Tris(hydroxymethyl)-aminomethan (Tris)

CALBIOCHEM-BEHRING, USA

Zwittergent 12 (ZB-12)

RIEDEL-de HAEN AG, Hannover

Silbernitrat
Glycin
Trichloressigsäure (TCA)

GIBCO, Schottland

RPMI-1640

BIOCHROM KG, Berlin

Glutamin

SCOTISH ANTIBODY PRODUCTION UNIT, Glasgow, Schottland

Esel-anti-Kaninchen-IgG

B.2. Medien und Pufferlösungen

IKM = Inkomplettes Medium :	1 % RPMI, 24 mM NaHCO ₃ , 25 mM HEPES, 1mM Glutamin, 33 mg/l Gentamycin, pH 7.1
KM = Komplettes Medium :	IKM + 10 % Humanserum
Einfrierlösung :	0,9 % NaCl, 4,2 % Sorbitol, 28 % Glycerin
Blockermischung :	Antipain, Bestatin, Pepstatin, alle in Konzentration 0,01 % in 70 % Methanol
MWP = Merozoitenwaschpuffer:	11 mM Triäthanolamin, 1mM Essigsäure, 5mM Glucose, 0,5 mM MgCl ₂ , 0,005 mM CaCl ₂ , 0,15 M NaCl, 2 mM PMSF, 1 % Blockermischung (v/v)
Puffer A:	0,1 M Tris/HCl, pH 7,6, mit 5mM MgCl ₂ , 2 mM PMSF, 1 mM PCMB, 5 mM EDTA, 1 % Blockermischung (v/v)
Aufschlußpuffer:	65 mM Tris/HCl, pH 6,8, mit 0,3 % SDS, 5 % Mercaptoäthanol, 10 % Glycerin
Sammelgel:	125 mM Tris/HCl, pH 6,8, 3 % Acrylamid, 0,1 % SDS, 1,3 mM Ammoniumperoxodisulfat, 0,05 % TMED
Trenngel:	5%: 0,375 M Tris/HCl, pH 8,8, 5 % Acrylamid, 0,1 % SDS, 0,075 % TMED, 1,3 mM Ammoniumperoxodisulfat 20%: 0,375 M Tris/HCl, pH 8,8, 20 % Acrylamid, 0,1 % SDS, 0,025 % TMED, 0,433 mM Ammoniumperoxodisulfat
Elektrophoresepuffer:	0,2 M Glycin, 25 mM Tris, 0,1 % SDS
Immunoelektrophoresepuffer:	43 mM Diäthylbarbitursäure-Na-Salz, 43 mM Na-Acetat, 0,1 % NaN ₃

Kopplungspuffer:	0,1 M NaHCO_3 , 0,5 M NaCl, pH 8,0
Transferpuffer:	25 mM Tris, 192 mM Glycin, 20 % (v/v), Methanol, 0,05 % SDS
TBS/BSA:	50 mM Tris/HCl, pH 7,4, 0,15 M NaCl, 0,1 % NaN_3 , 2,5 % BSA
PBS/Tween/BSA:	0,1 M PBS, pH 7,4, 0,05 % Tween- 20, 1 % BSA
PBS/Tween:	0,1 M PBS, pH 7,4, 0,05 % Tween- 20
IP-Puffer = Immunpräzipitations-Puffer	
IP1-Puffer:	50 mM Tris/HCl, pH 8,0, 5 mM EDTA, 2 % Trasylol, 2 % PMSF, 1 % Blockermischung
IP2-Puffer:	50 mM Tris/HCl, pH 8,0, 0,5 M NaCl, 5 mM EDTA, 1 % Triton-X-100 bzw. 0,5 % NP-40, 2 % Trasylol, 2 % PMSF, 0,01 % BSA, 1 % Blocker- mischung
IP3-Puffer:	IP2, ohne Detergenz und BSA
Kakodylat-Puffer:	Stammlösung: 0,2 M Na-Kakodylat, 4 mM CaCl_2 , pH 7,2 (5 N HCl). Vor Gebrauch 4:1 mit H_2O verdünnen
NaJ-Waschlösung:	15 mM NaJ in MWP

C. METHODEN

1) Kulturen

Zur Anwendung kam der *Plasmodium falciparum* Stamm FCB1 aus Kolumbien, der nach der 'candle jar' Methode von Trager und Jensen (1976) in einer kontinuierlichen Kultur bei 90 % N₂, 5 % O₂, 5 % CO₂ in 15 ml Kulturschalen in kompletten Medium (KM, s. Kap. B. 2) gehalten wurde. Mediumwechsel erfolgte mindestens alle 24 h. Nach Erreichen einer Parasitämie von 10 % wurden die Parasiten mit Hilfe der Plasmagelmethode (PG, s. Kap. C. 2) angereichert und mit frischen Erythrozyten der Blutgruppe A, Rh+ auf 1 % Parasitämie verdünnt. Parallel wurde eine permanente Kultur (Dauerkultur) ohne Synchronisierung mit einer Parasitämie von 0,1-0,2 % gehalten. Die Bestimmung der Parasitämie erfolgte, nach Methanol-Fixierung und Giemsa-Färbung, durch Auszählung von etwa 300 Parasiten.

Um einer Veränderung der Parasiten im Laufe einer kontinuierlichen in vitro Kultur vorzubeugen, wurden aus einer Kultur mit mehr als 10 % Ringe 1 ml Aliquots mit Einfrierlösung (s. Kap. B. 2) versetzt und in flüssigem Stickstoff tiefgefroren. In Abständen von 4 bis 5 Monaten wurden diese gefrorenen Zellkulturen bei 37°C inkubiert, mit 3,5 % NaCl verdünnt, mit KM gewaschen und wieder in Kultur gesetzt.

2) Anreicherung und Synchronisierung der Parasiten

Anreicherung der Parasiten erfolgte routinemäßig mit der Plasmagelmethode nach Jensen, 1977; Pasvol et al., 1978 und Reese et al., 1979. Aufgrund der unterschiedlichen Dichten der nichtinfizierten Erythrozyten und der verschiedenen

erythrozytären Formen von *Plasmodium falciparum* (Ringe, Trophozoiten, Schizonten, Segmenter) werden mit dieser Methode die reifen Formen (Trophozoiten, Schizonten, Segmenter) von den Ring-Formen und den nichtinfizierten Erythrozyten abgetrennt. Dazu wurde die Kultur (15 %ig in KM) 1:1 mit Plasmagel (Roger Bellon, Paris) versetzt, gut suspendiert und 30 min. bei 37°C inkubiert. Nach dieser Zeit waren die reifen Formen mit einer Parasitämie von 85-95 % im Überstand angereichert.

Zur einer noch besseren Synchronie wurde eine solche Plasmagel-Behandlung mit einer Kultur, die vorwiegend späte Stadien (Schizonten, Segmenter) enthielt, durchgeführt. Anschliessend wurde bei einer Parasitämie von 5-10 % nur eine kurze Invasionszeit von 4 bis 6 h erlaubt, und die noch vorhandenen reifen Stadien mit einer 5 %igen Sorbitollösung (Lambros und Vanderberg, 1979) lysiert. Die mit jungen Stadien befallenen Erythrozyten bleiben bei dieser Behandlung erhalten, und können aus dem Sediment isoliert werden. Im Überstand (5 min., 10.000 x g) befinden sich die Zellreste der reifen Stadien, die durch mehrmaliges Waschen mit KM aus der Kultur entfernt werden können.

3) Metabolische Markierung der Parasiten und Isolierung der Merozoiten

Für die Gewinnung der Merozoiten wurden aus einer synchronen Kultur durch PG-Behandlung junge Trophozoiten (25 - 30 h nach Merozoiteninvasion) angereichert und auf 0,2-0,3 % Zellkonzentration ohne Erythrozyten angesetzt. Die in vitro Markierung der Parasiten-Proteine erfolgte durch Zugabe von 5 µCi ³⁵S-Methionin /ml KM (NEN, spez. Akt. 1132Ci/µmol). Nach mehrmaligem Mediumswechsel (KM mit ³⁵S-Methionin, ca. alle 4 Stunden) wurden die aus den Erythrozyten freigesetzten Merozoiten durch Zentrifugation (5 min. bei 350 x g, RT) im Überstand angereichert. Die sich im Pellet befindlichen infizierten Erythrozyten wurden erneut mit KM, welches die

radioaktiv markierte Aminosäure enthielt, in Kultur zurückgesetzt. Je nach Synchronie der Kultur wurden in 2 bis 3 stündigem Abstand mehrmals Merozoiten gewonnen, was zu einer Markierungsdauer von 13 bis 21 h führte.

Die gewonnenen Merozoiten wurden nach der Methode von Mrema et al. (1982) durch Nylonmembranen (Versapor, Gelman, 3 μm und 1,2 μm) filtriert, um sie von Membranresten und Pigment zu befreien, und anschliessend 10 min. bei 4000 x g bei RT zentrifugiert. Das Merozoiten-Pellet wurde dreimal bei RT mit Merozoitenwaschpuffer (MWP, s. Kap. B. 2) gewaschen.

4) Jodierung der Oberflächenproteine

Die nach C. 3 gewonnen Merozoiten wurden mit MWP (ohne PMSF) gewaschen, die Zellzahl mit MWP auf $10\text{--}20 \times 10^7$ Zellen/50 μl eingestellt (Neubauer'sche Zählkammer) und mit 20 μl 1 %iger Glucose versetzt. Zu dieser Suspension wurden nacheinander 500 μCi $\text{Na-}^{125}\text{J}$ (spez. Akt. 15,66 mCi/ μg), 20 μl Laktoperoxidase/Glucoseoxidase gegeben und 10 min. bei 4°C inkubiert (Heidrich et al., 1983). Die Reaktion wurde durch Zugabe von NaJ-Waschlösung (s. Kap. B. 2) beendet und die Zellen mit der gleichen Lösung gewaschen. Freies Jod wurde nach Extraktion der Zellen (5 mM Zwittergent od. 0,5 % NP-40) über 1 ml oder 2 ml Sephadex-G-25-Säulchen entfernt.

5) Extraktion der Merozoiten-Proteine

Oberflächenmarkierte oder mit ^{35}S -Methionin metabolisch markierte Merozoiten wurden mit 1 % Triton X-100 oder 0,5 % Nonidet P-40 (NP-40) in 0,1 M Tris/HCl pH 7,6 (Puffer A, s. Kap. B. 2) über 1 h bei Eistemperatur extrahiert. Durch Zentrifugation (60 min. bei 4°C und 100.000 x g) wurden nichtlösliche Proteine, DNA, sowie Reste des abgebauten Haemoglobins (Malaria pigment, Haemozoin) von den löslichen

Merozoitenproteinen abgetrennt. Die gewonnenen Proteine wurden entweder sofort weiterverarbeitet (s. C. 6, 7, 8 und 11. 4. 2) oder bei -70°C tiefgefroren. Die Proteinbestimmung erfolgte nach der Methode von Heil und Zillig (1970) auf Zelluloseazetatmembranen mit BSA als Proteinstandard.

6) Gelchromatographie

Säulenchromatographische Trennung der Merozoiten-Proteine nach Molekulargewicht wurde auf Sephacryl S300 in einer Säule von 140 cm x 1,5 cm, äquilibriert mit Puffer A (jedoch mit 0,2 mM PMSF), durchgeführt. Aufgetragen wurde eine Mischung aus extrahiertem, unmarkiertem Merozoitenmaterial (ca. 5-10 mg, max. Vol 5 ml) und ca. 12×10^6 cpm ^{35}S -Methionin markiertem Material als Tracer. Die Elutionsgeschwindigkeit betrug 5,5 ml/h bei 4°C und Fraktionen von 1,8 ml wurden gesammelt. Das Elutionsprofil wurde durch Messen eines Aliquots der Fraktionen im Szintillationscocktail (Rotizint 22) mit einem Szintillationszähler (Kontron, MR 300) ermittelt. Die Überprüfung der Fraktionen erfolgte nach TCA (Trichloressigsäure)-Fällung mittels SDS-PAGE und Fluorographie. Nach Auswertung der Fluorogramme wurden die Fraktionen nach ihren Proteinmuster in Pools zusammengefaßt und bis zu ihrer Weiterverarbeitung bei -20°C aufbewahrt.

7) Ionenaustausch-Chromatographie

Für die Ionenaustausch-Chromatographie kam das FPLC - System der Firma Pharmacia zur Anwendung. Die nach C. 6 gepoolten Fraktionen wurden auf dem Anionenaustauscher MonoQ, äquilibriert mit Puffer A (0,2mM PMSF), durch lineare bzw. stufenförmige Gradienten zwischen 0-0.5 M NaCl in Puffer A getrennt. Die Flußgeschwindigkeit betrug 1,2ml/min/Fraktion

bei 4°C. Die Verteilung der Proteine wurde durch Szintillationsmessung eines Aliquots der einzelnen Fraktionen bestimmt, das Proteinemuster in den einzelnen Fraktionen mittels SDS-PAGE und Fluorographie.

8) SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) und Vorbereitung der Proben für die SDS-PAGE

SDS-PAGE wurde nach der Methode von Laemmli (1970) in logarithmischen Gradienten von 5-20 % bzw. 10-20 % durchgeführt. Der pH im Trenngel betrug 8,8, in dem 3 %igen Sammelgel 6,8. Proben für die SDS-PAGE wurden mit 50 % TCA bis zur Endkonzentration 10 % über eine halbe Stunde bei 4°C in Eis gefällt, anschließend mit Bromthymolblau in 80 % Äthanol versetzt und mit 1 N NaOH neutralisiert. Nach Trocknung wurden die Proben in zweifach konzentriertem Aufschlusspuffer (s. Kap. B. 2) aufgenommen und 20 min. bei 56°C erhitzt. Die Laufzeit der Elektrophorese betrug etwa 16 h bei 100 V und 4°C. Nach Fixierung der Gele in 20 % TCA oder 50 % Methanol wurden sie mit 0,1 % Comassie Brilliant Blue (CBB R 250) in Eisessig - Methanol - H₂O (1:5:4) gefärbt und mit Eisessig - Isopropanol - H₂O (1,5:1:17,5) entfärbt oder aber mit Silber nach Wray (1981) gefärbt. Für die Fluorographie wurden die Gele mit PPO/DMSO oder 30 min. mit Enlightning (NEN) behandelt und anschließend getrocknet. Die Fluorogramme der Gele wurden auf Kodak X-Omat AR Film bei -70°C erzeugt.

9) Kontrollierter limitierter Protease-Abbau in der zweiten Dimension einer SDS-Gelelektrophorese (nach Cleveland et al., 1977)

Aus der ersten Dimension (SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese, 5-20 %) wurde die gewünschte Gelbande nach Färben (s.

C. 8) herausgeschnitten und 5 min. in einer Lösung von 0,125 M Tris/HCl, pH 6,8 und 0,1 % SDS geschüttelt. Anschließend wurden die Banden in Aufschlußpuffer 5 min. gekocht. Die getrockneten Banden wurden zerkleinert und in die Taschen eines zweiten Gels (10-20 % Acrylamid) eingebracht. Pro Tasche wurde 4 µg Protease, gelöst in 0,125 M Tris/HCl, pH 6,8, mit 0,1 % SDS, 25 % Glycerin, aufgetragen und 2 h bei 50 V, anschließend 14 h bei 100 V elektrophoretisch getrennt. Nach Trennung wurde das Gel, wie unter C. 8 beschrieben, mit CBB R 250 gefärbt, oder mit PPO/DMSO für die Fluorographie behandelt.

10) Elektro-Elution

Die Elektro-Elution wurde nach Hunkapiller et al. (1983) durchgeführt. Für die Isolierung der Proteine aus dem Polyacrylamidgel wurde die gewünschte Bande aus dem Gel herausgeschnitten, zerkleinert und in dem Elutionsgefäß gegeben. Die Elution erfolgte bei RT und 100 V in Ammoniumhydrogencarbonat-SDS-Puffer (50 mM Ammoniumhydrogencarbonat, 0,1 % SDS) über 24 h.

11) Immunologische Methoden

11. 1) Immunisierung

Die gewonnenen Proteine (nach Kap. C. 6, 7 und 10) wurden gegen 0,1 M PBS dialysiert, gefriergetrocknet, in PBS gelöst und mit Freund's komplettem Adjuvans (FCA) 1 : 1 versetzt. Vor der Immunisierung wurde dem Kaninchen Präimmunserum abgenommen, anschließend etwa 20-40 µg 83 kDa-Protein bzw. etwa 15 µg 43 kDa-Protein dem Tier subcutan entlang der Wirbelsäule injiziert. In Abständen von drei Wochen

erfolgten weitere Injektionen (boosts) mit derselben Proteinmenge in Freund's inkomplettem Adjuvans. Sieben Tage nach der dritten (oder vierten) Verabreichung wurde Probeblut aus der Ohrvene entnommen. Eine Woche nach der letzten Immunisierung wurde das Kaninchen durch Herzpunktion ausgeblutet. Immunserum wurde, nach Absetzen des Blutkuchens über Nacht, bei 4°C 30 min. bei 10.000 x g zellfrei zentrifugiert, und in Aliquots bei -20°C eingefroren.

11. 2) Isolierung von Immunglobulinen

Isolierung der IgGs erfolgte an einer Protein A Cl-4B-Sepharose (Pharmacia) Affinitätssäule von 10 cm Länge und 0,9 cm Durchmesser bei 4°C. Pro Trennung wurden 3 ml Kaninchenserum auf die mit 0,1 M PBS, pH 8,0 äquilibrierte Säule aufgetragen, und mit dem gleichen Puffer solange gewaschen, bis die Adsorption bei 280 nm < 0,02 war. Elution erfolgte mit Glycin/HCl, pH 3,0, bei einer Flußrate von 5,5 ml/h, und 1,8 ml Fraktionen wurden gesammelt.

Die Konzentration von Gesamt-IgG wurde nach der Methode von Bradford (1976) bei 595 nm, mit BSA als Eichsubstanz bestimmt.

11. 3) Immunelektrophorese

Die Reinheit der IgG-Fraktionen wurde mit der eindimensionalen Immunelektrophorese nach Grabar und Williams (1953) geprüft. Als Trägermaterial diente 1 % Agarose M (LKB), als Elektrophorese-Puffer Na-Barbiturat-Puffer, pH 8,3 (s. Kap. B. 2). Pro Objektträger wurde eine Spannung von 5 mA angelegt, die Laufzeit betrug 2 h. Für die Diffusion wurde Anti-Kaninchen-IgG oder Anti-Kaninchen-Gesamt-Serum von der Ziege verwendet. Nach 48 h bei 4°C wurden die Gele

getrocknet, mit Comassie Brilliant Blue gefärbt (0,5 % CBB R 250 in Eisessig - Methanol - H_2O , 1:4:5) und in derselben Lösung ohne Farbstoff entfärbt.

11. 4) Affinitätschromatographie

11. 4. 1) Kopplung von IgG an die CNBr-aktivierte Sepharose Cl-4B bzw. an Eupergit C

Die Kopplung der IgG an die CNBr-aktivierte Sepharose erfolgte nach den Angaben des Herstellers. Die nach 11. 2 isolierten Immunglobuline wurden 48 h gegen Kopplungspuffer (s. Kap. B. 2) dialysiert. An das gequollene und mit Kopplungspuffer äquilibrierte Gelmaterial (10 ml) wurde 5 mg Gesamt-IgG/ml Gel durch langsames end-over-end-Rotieren über 16 h bei 4°C gebunden. Noch freie Bindungsstellen wurden mit 0,1 M Tris/HCl, pH 8,0, blockiert. Nach alternierendem Waschen in 0,1 M Na-Acetat, pH 3,0, und Kopplungspuffer wurden die gekoppelten IgG's bei 4°C gelagert.

Alternativ wurde als Trägermaterial für die Immunglobuline Eupergit C (Röhm-Pharma) verwendet. An das mit 0,05 M PBS und 0,15 M NaCl, pH 7,4 äquilibrierte Eupergit C wurde 5 mg/ml IgG über 72 h bei 4°C in 0,05 M PBS + 0,15 M NaCl, pH 7,4 gekoppelt. Die unspezifischen Bindungsstellen wurden über 16 h bei 4°C mit 1 M Aethanolamin, pH 8,0 gesättigt.

11. 4. 2) Affinitätschromatographische Trennung von Merozoiten-Proteinen

Die mit IgG-gekoppelten Immunoabsorbens-Säulen dienten zur immunologischen Reinigung der 83 bzw. 43 kDa-Proteine. Ausgehend vom ^{35}S -Methionin markiertem Gesamtmerozoiten-Extrakt, wurde, nach Auftragen auf die Säule, solange mit

Äquilibriumspuffer (Puffer A) gewaschen, bis alles ungebundene Material entfernt war. Elution erfolgte mit 2 M KSCN in Puffer A. Zur Neutralisation von KSCN wurde in die Sammelgefäße 0,5 M Tris/HCl, pH 9,5 vorgelegt. Ein Aliquot der eluierten Fraktionen wurde in SDS-PAGE getestet, der Rest 48 h gegen Puffer A dialysiert.

11. 5) Immunoblot mit Protein A bzw. Protein G (a), mit Peroxidase-konjugiertem (b), oder mit alkalischer Phosphatase-konjugiertem (c) zweiten Antikörper

Der Westernblot wurde nach der Methode von Towbin (1979) durchgeführt. Die Übertragung der Proteine (nach SDS-PAGE) auf die Nitrozellulose (Bio-Rad) erfolgte bei 4°C über 3 h bei 350 mA in Transferpuffer (s. Kap. B. 2) in einer Bio-Rad Transblotzelle. Der spezifische Nachweis der Antigen-Antikörper-Reaktion erfolgte nach drei verschiedenen Methoden.

a) mit ^{125}J -Protein A bzw. G

Die Absättigung unspezifischer Bindungsstellen auf der Nitrozellulosefolie erfolgte 2 h bei RT mit TBS/BSA (s. Kap. B. 2). Anschließend wurde 1 h bei RT oder 16 h bei 4°C mit dem ersten Antikörper (Verdünnung 1:100 in TBS/BSA) unter Schütteln inkubiert und dann mehrmals mit TBS bei RT gewaschen. Nachweis der gebundenen spezifischen IgGs erfolgte durch Inkubation der Nitrozellulose-Streifen über 1 h bei RT mit ^{125}J -Protein A (Amersham, spez. Akt. 30 mCi/mg) bzw. ^{125}J -Protein G (Amersham, spez. Akt. 12 mCi/mg; 0,5 $\mu\text{Ci}/10\text{ ml}$ TBS/BSA). Nach intensivem Waschen mit TBS wurden die Streifen getrocknet und autographiert.

b) mit Peroxidase-konjugiertem zweiten Antikörper

Nach Transfer wurde die Nitrozellulose je zweimal 10 min. in PBS/Tween/BSA (s. Kap. B. 2) und PBS/Tween (s. Kap. B. 2)

bei 37°C abgesättigt. Die Inkubation mit dem ersten Antikörper (Verdünnung 1:100 bzw. 1:200 in PBS) erfolgte über 1 h bei RT oder 16 h bei 4°C. Anschließend wurde je zweimal 5 min. in PBS/Tween/BSA und PBS/Tween bei RT gewaschen, 1 h bei RT mit dem Peroxidase-konjugierten Antikörper (Schwein-anti-Kaninchen-IgG, Verdünnung 1:150 in PBS) inkubiert, und je zweimal 5 min. mit PBS/Tween/BSA bzw. PBS/Tween und 5 min. mit PBS gewaschen. Das Substrat für die Farbreaktion, 4-Cl-Naphtol in 0,1 M Tris/HCl, pH 7,3 (30 mg 4-Cl-Naphtol, 50 ml 0,1 M Tris), wurde mit H₂O₂ (15 µl) aktiviert; nach Blaufärbung wurde die Reaktion mit H₂O dest. gestoppt.

c) mit alkalischer Phosphatase-konjugiertem zweiten Antikörper

Bis zu der Farbreaktion galten die schon unter b) beschriebenen Schritte. Zum Nachweis der Antigen-Antikörper-Reaktion wurde 5-Brom-4-Chlor-3-Indonyl-Phosphat (5 mg) zu 20 ml einer Lösung von 2-Amino-2-Methyl-1,3-Propandiol (10,2 g/l) und MgCl₂ x 6 H₂O (10 mg/l) gegeben, und damit die Nitrozellulosestreifen 15 bis 30 min. bei 37°C inkubiert. Nach Auftreten der Blaufärbung wurde die Reaktion mit 5 % Essigsäure beendet.

11. 6) Immunpräzipitation

Immunpräzipitation wurde mit Triton X-100-, NP-40- oder Zwittergent-Extrakten von ³⁵S-Methionin oder ¹²⁵I markiertem Material durchgeführt. Das Antigen wurde auf das vierfache Volumen mit IP-Puffer 1 (s. Kap. B. 2) verdünnt und anschließend 3 h auf Eis mit 25 µl Antiserum inkubiert. Der gebildete Antigen-Antikörper-Komplex wurde mit 100 µl Ziegen-anti-Kaninchen-Serum oder mit 40 µl Esel-anti-Kanin-

chen-IgG über 16 h bei 4°C quantitativ präzipitiert, und anschließend 5 min. bei 1000 x g zentrifugiert. Das entstandene Pellet wurde vier Mal mit je 1 ml IP-Puffer 2 (je 5 min. bei 1000 x g) vier Mal mit IP-Puffer 3 (je 5 min. bei 1000 x g) gewaschen, in zweifach konzentriertem Laemmli-Auflösungspuffer aufgenommen und 20 min. bei 56°C denaturiert. Analyse der Proben erfolgte durch SDS-PAGE und Fluorographie.

11. 7) Indirekte Immunfluoreszenz-Test (IFA)

IFA wurde mit frisch isolierten Merozoiten oder mit Kulturen, die mit Merozoiten angereichert waren, durchgeführt. Nach der Ernte wurden die Parasiten zweimal mit MWP (+5 % FKS) gewaschen, und anschließend mit 1 % Formaldehyd in PBS 15 min. fixiert. Die fixierten Merozoiten wurden auf Objektträger ausgestrichen, luftgetrocknet, und dreimal 10 min. in PBS gewaschen, 30 min. bei RT mit 100 µl ersten Antikörper (Verdünnung 1:100 in PBS) in einer feuchten Kammer inkubiert, und erneut dreimal 10 min. mit PBS gewaschen. Inkubation mit dem zweiten Antikörper (Ziegen-Anti-Kaninchen-IgG, FITC-konjugiert, Verdünnung 1:10 in PBS) erfolgte über 30 min. bei RT. Nach erneutem Waschen in PBS wurden die Präparate in 90 % Glycerin eingebettet, in einem Zeiss-Fluoreszenzmikroskop betrachtet, und mit Kodak Ektachrom 160 oder Agfapan 400 fotografisch dokumentiert.

11. 8) In vitro Inhibitions- und Toxizitäts-Test (IT-Test)

Für den IT-Test wurden isolierte IgGs verwendet, die 24 h gegen inkomplettes Medium dialysiert und steril filtriert (Gelman, Acro, LC 13; 0,2 µm) waren. Je nachdem, ob der Antikörper beim Invasionsprozeß oder nach Ringbildung

während des erythrozytären Wachstums in Kultur zugesetzt worden war oder nicht, wurde zwischen a) invasions-inhibierende und b) toxischer Wirkung des Antikörpers differenziert.

Für a) und b) wurden aus einer hochsynchronen Kultur mittels der Plasmagelmethode Schizonten angereichert und auf 96 well Mikrotiterplatten (100 μ l/well) in 1 %iger Parasitämie und 1,8 %igem Haematokrit in KM angesetzt, wobei für a) 100 μ l einer Antikörperverdünnung (von 1 mg IgG/ml bis 7,8 μ g/ml IgG), und für b) ausschließlich 100 μ l KM vorgelegt wurden. Erreichte die Entwicklung der Parasiten das Ringstadium, wurde bei a) und b) das Medium entfernt, beide Kulturen dreimal kurz (3 min., 750 x g) mit KM gewaschen, und anschließend zu a) und b) 1 μ Ci 3 H-Hypoxanthin/100 μ l KM/well, bei b) jedoch zusätzlich in einer analogen Verdünnung (siehe oben) IgGs gegeben. Nach erneuter Entwicklung zu reifen Schizonten (36-40 h radioaktiver 3 H-Hypoxanthineinbau) wurde das Wachstum der Parasiten durch Einfrieren bei -20°C beendet. Die aufgetauten, geplatzten Zellen wurden mit dem Inotech-Zellharvester für 96 well Mikrotiterplatten (Dunn) auf Filterpapier (Glass Fibre Filter, Inotech) geerntet, nacheinander mit H_2O , 5 % TCA und MeOH gewaschen und anschließend getrocknet (15 min., 100°C). Die getrockneten Filterpapierstücke wurden für die Zählung mit Szintillationsflüssigkeit (Rotizint 22) versetzt und im Szintillationsgerät MR 300 (Kontron) im 3 H-Kanal gemessen.

12) Elektronenmikroskopische Untersuchungen

Die elektronenmikroskopischen Routineuntersuchungen wurden von Frau Monika Matzner durchgeführt.

a) Zur Überprüfung der Reinheit

Für die routinemäßige Kontrolle der Merozoiten wurden die Parasiten nach der Ernte mit MWP gewaschen und mit 2,5 %

Glutaraldehyd in Kakodylat-Puffer (s. Kap. B. 2) fixiert. Färbung und Kontrastierung erfolgten mit 1 % OsO_4 in Kakodylat-Puffer. Anschließend wurden die Merozoiten durch ansteigende Aethanolkonzentration dehydriert und in Epon 812 eingebettet. Nach Polymerisation des Harzes wurden Ultradünnschnitte hergestellt, auf Kupfernetzchen gebracht und nach Reynolds et al. (1971) doppelkontrastiert. Die Betrachtung der Präparate erfolgte in einem JEOL 100 B Elektronenmikroskop.

b) Immunelektronenmikroskopie (IEM)

Merozoiten für die IEM wurden mit 0,1 % Glutaraldehyd in MWP fixiert und mit einer 60 %igen Zuckerlösung versetzt. Nach Herstellung von Kryo-Ultradünnschnitten (bei -85°C) und Transfer auf collodiumbeschichtete, kohlegedampfte Kupfernetzchen wurden die Präparate in PBS gewaschen, mit 2 %iger Gelatinelösung in PBS (PBSG) gesättigt, gewaschen (PBS) und 1 h mit dem ersten Antikörper (1:1500 in PBSG für das A-83- und 1:250 für das A-43-Serum) bei RT inkubiert. Nach erneuter Waschung in PBSG wurde mit Protein A-Gold (1:3 in 1 % BSA/PBS) 1 h bei RT inkubiert, und anschließend mit PBSG, PBS und H_2O gewaschen. Die Fixierung erfolgte in 2 % Uranylacetat/Oxalsäure, pH 7,0. Die Präparate wurden in Methyl-Zellulose : 3 %igem Uranylacetat : H_2O = 9:1:3 eingebettet und im Elektronenmikroskop ausgewertet.

D. ERGEBNISSE

1) Reinheit der Merozoiten

Die Isolierung von Merozoiten aus den Kulturüberständen unter Anwendung von Nylon-Filtern unterschiedlicher Porengröße wurde von Mrema et al. (1982) beschrieben. Mit dieser Methode gelingt die Abtrennung der Merozoiten von nicht-infizierten Erythrozyten, sowie vom Haemoglobin, Pigment und Membranresten der lysierten roten Blutkörperchen. Der Nachweis der Reinheit der auf diese Weise gewonnenen Merozoiten wurde mit folgenden Methoden durchgeführt: SDS-PAGE, Immunoblot, licht- und elektronenmikroskopischen Untersuchungen. In Abb. 2 sind Merozoiten nach einer Ernte lichtmikroskopisch dargestellt. Die dunkelviolette Farbe der Parasiten nach Fixierung und Giemsa-Färbung ist typisch für die intakten Merozoiten.

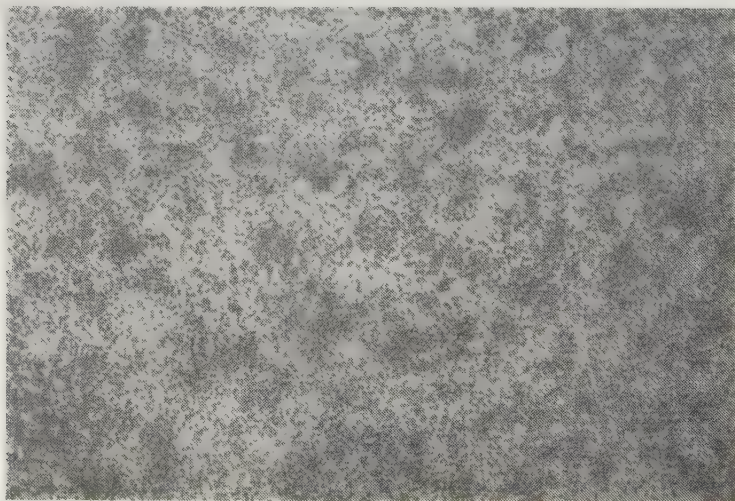


Abb. 2. Lichtmikroskopische Aufnahme von isolierten Merozoiten (Giemsa-gefärbter Ausstrich). Vergrößerung: 1000 fach.

Erst im Elektronenmikroskop jedoch kann Zustand und Reinheit der Parasiten eindeutig beurteilt werden. Die elektronenmikroskopische Aufnahme der geernteten Merozoiten (Abb. 3) zeigt die für intakte Merozoiten typische dichte Oberflächenstruktur, den sog. 'coat', der während der Invasion abgelöst wird (Aikawa et al., 1978).

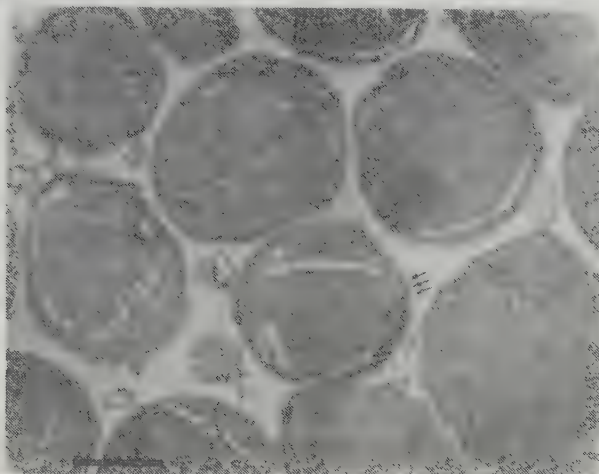


Abb. 3. Elektronenmikroskopische Aufnahme von isolierten Merozoiten. Der die Parasiten umhüllende 'Oberflächencoat' ist mit Pfeilen markiert. Vergrößerung: 32.000 fach, Markierungsstrich: 0,5 μm .

Durch routinemäßige Überprüfung der Merozoitenpräparationen im EM konnte gezeigt werden, daß diese frei waren von Erythrozyten, sowie frei von Vesikelstrukturen, die aus Erythrozyten-Ghosts entstehen können.

Ein Vergleich der mit Triton X-100 extrahierten Merozoiten-Proteine mit Proteinen aus Erythrozyten-Membranen in der SDS-PAGE nach der Comassie-Färbung zeigt (Abb. 4, Spuren 1 und 2), daß die für die Erythrozyten typischen Spektrin-Banden im MG-Bereich von 200-250 kDa in den Merozoiten fehlen.

Auch mittels Immunoblot wurden die Merozoiten-Extrakte auf

ihre eventuelle Kontaminationen mit Erythrozyten-Membran-Proteinen untersucht. Abb. 4, Spur 3 zeigt, daß keine Proteine des Merozoiten-Extraktes durch das verwendete Anti-Human-Erythrozyten-Membran Serum (AEM) vom Kaninchen erkannt werden.

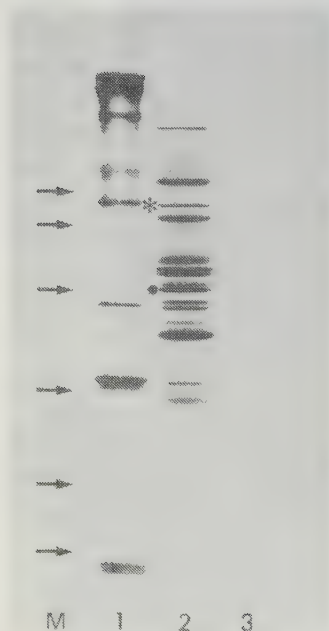


Abb. 4. Nachweis der Reinheit der isolierten Merozoiten in der SDS-PAGE nach Comassie Färbung. Spur 1: Erythrozyten-Membranen, Spur 2: Triton X-100-Extrakt von Merozoiten. Die hochmolekularen Spektrin-Banden fehlen in dem Merozoiten-Extrakt. Spur 3: Immunoblot von Merozoiten-Extrakt inkubiert mit Anti-Human-Erythrozyten-Membran Serum (AEM). Proteine der Erythrozyten-Membrane können immunologisch im Merozoiten-Extrakt nicht nachgewiesen werden. Die Pfeile bedeuten Molekulargewichtsmarker, von oben nach unten: Phosphorylase b (97,4 kDa), Albumin (68 kDa), Ovalbumin (43 kDa), Carbonanhydrase (30 kDa), Laktoglobulin (18 kDa) und Cytochrom-c (12,3 kDa). Mit einem Stern (*) ist das 83 kDa-, mit einem Punkt (●) das 43 kDa-Protein markiert.

2) Extraktion der Merozoiten-Proteine und Identifizierung der für die humorale Immunität relevanten Antigene

Die mit MWP gewaschenen Merozoiten (s. C. 3) wurden mit

Triton X-100 oder NP-40 extrahiert, wobei in MWP, Extraktions-, sowie in allen weiteren Puffern eine Mischung aus Proteaseblockern (s. B. 2) zugefügt wurde, um eine mögliche Aktion von Proteasen zu hemmen bzw. herabzusetzen. Das Bandenmuster beider Detergentien-Extrakte (representative Comassie-Färbung s. Abb. 4, Spur 2) war identisch. Ein Fluorogramm der mit ^{35}S -Methionin markierten Merozoiten-Proteine, ist in Abb. 5, Spur 1 gezeigt. Eine große Anzahl Proteine im Molekulargewichts-Bereich von 300-15 kDa wurde extrahiert, wobei die meisten Proteine ein Molekulargewicht von 100 bis 30 kDa aufwiesen.

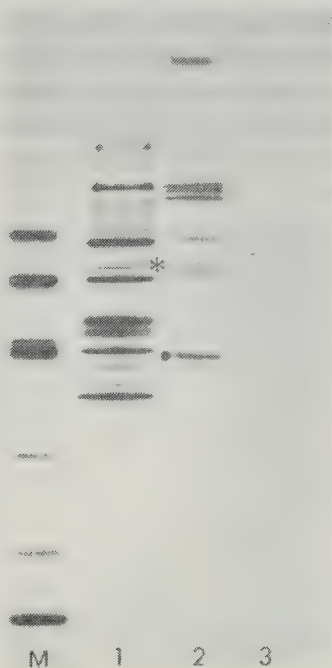


Abb. 5. Immunpräzipitation eines Triton X-100-Extraktes der isolierten Merozoiten mit menschlichem Immunserum (OV-Antiserum). Spur 1: Merozoiten-Extrakt, Spur 2: Immunpräzipitation des Extraktes mit OV-Antiserum, Spur 3: Kontrollpräzipitation des Extraktes mit normalem humanen Serum. Stern (*) markiert das 83 kDa-Protein, Punkt (●) das 43 kDa-Protein. Molekulargewichtsmarker s. Abb. 4.

Die Immunpräzipitation dieses Extraktes mit einem polyklonalen Misch-Antiserum (OV-Antiserum), dessen Einzelseren alle aus einem endemischen Gebiet (Burkina Faso, Afrika) stammen, sollte klären, welche der Merozoiten-Proteine eine humorale Immunantwort hervorrufen können. Das Serum

der immunen Einheimischen enthält Antikörper vorwiegend gegen Proteine mit folgenden Molekulargewichten: 190 kDa, 165-150 kDa, 130 kDa, 110 kDa, 83 kDa, 79 kDa und 43 kDa (Abb. 5, Spur 2). Die Immunpräzipitation des Extraktes mit normalem Humanserum (HS) zeigt, daß keines der Merozoiten Proteine von HS erkannt wird (Abb. 5, Spur 3).

3) Gelchromatographische Trennung der Merozoiten-Proteine

Die Trennung der Merozoiten-Proteine auf Grund ihres Molekulargewichtes wurde auf einer Sephacryl S300-Säule durchgeführt. Frisch isolierte, mit Triton X-100 oder NP-40 extrahierte Merozoiten-Proteine, bestehend aus einer Mischung von mit ^{35}S -Methionin markiertem und unmarkiertem Material (s. C. 6; max. Volumen 5 ml), wurden auf die Säule aufgetragen und mit Puffer A eluiert.

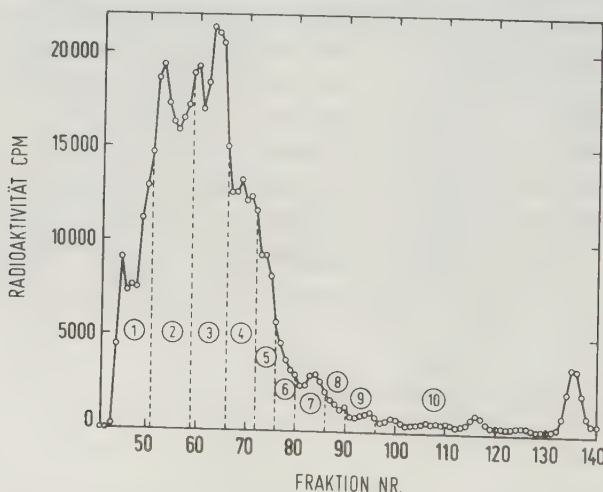


Abb. 6. Elutionsprofil einer gelchromatographischen Trennung nach Molekulargewicht von Merozoiten-Proteinen an Sephacryl S300. Die in einem breiten Peak eluierten Proteine wurden in 10 Pools (s. gebrochene Linien) zusammengefaßt und mit Hilfe von SDS-PAGE analysiert (s. Abb. 7).

Das Elutionsprofil der S300 Trennung (Abb. 6) ist von Versuch zu Versuch reproduzierbar. Durch die Vielzahl der extrahierten Proteine ist es mit dieser Technik nicht möglich, einzelne Proteine rein zu isolieren. Vielmehr verteilen sie sich von Fraktion 42 bis 120 in Gruppen mit unterschiedlichen Molekulargewichten.

Zur routinemäßigen Kontrolle der Proteinverteilung wurde aus jeder dritten Fraktion ein Aliquot entnommen, mit TCA-gefällt und die Proteine durch SDS-PAGE getrennt und fluorographiert (Abb. 7). Was sich schon im Elutionprofil der Proteine andeutet, wird durch die SDS-PAGE bestätigt. Bei der Verteilung der Proteine findet ein fließender Übergang von hochmolekularen zu niedermolekularen Proteinen statt. In den Fraktionen 47-60 finden sich vorwiegend Proteine von MG 300-43 kDa, in den Fraktionen 61-78 solche von MG 100-30 kDa und in den Fraktionen 79-110 Proteine von MG 40-10 kDa.

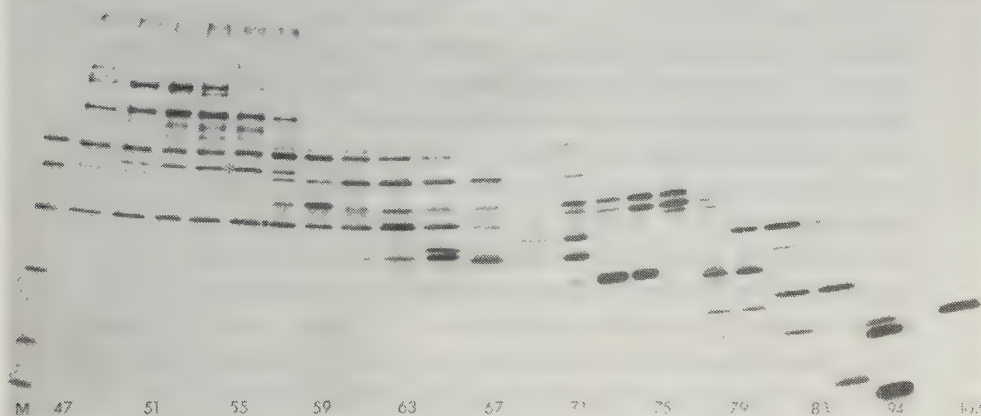


Abb. 7. Fluorogramm (nach SDS-PAGE) verschiedener Fraktionen von der S300-Trennung (s. Abb. 6). Das 83 kDa-Protein (s. * -Markierung) befindet sich in den Fraktionen 43-57. Markiert ist auch das 43 kDa-Protein (s. ●). Molekulargewichtsmarker s. Abb. 4.

Das Elutionsprofil (Abb. 6) zeigt noch einen Nachpeak bei Fraktionen 132-138. Jedoch konnten in der SDS-PAGE in diesen Fraktionen keine Proteine nachgewiesen werden. Vermutlich handelt es sich hier um kleinere Peptide oder freies Methionin.

Aufgrund der Fluorographie wurden die Proteine in 10 Pools zusammengefaßt. Das 83 kDa Protein, dessen native Isolierung vorgenommen wurde, befand sich in den Pools 1 und 2 (s. Markierung *, Abb. 7). Sie dienten als Ausgangsmaterial für die weitere Reinigung.

4) Ionenaustausch-Chromatographie

Bei der weiteren Reinigung des 83 kDa-Proteins kam der Anionenaustauscher MonoQ (Pharmacia) in Verbindung mit dem FPLC-System derselben Firma zur Anwendung. Vor Durchführung der Chromatographie wurden die Pufferlösungen (Puffer A, mit 0,5 M oder ohne NaCl) mit Helium entgast und sowohl Puffer als auch Probe durch 0,2 µm Filter (Millex-GS, Millipore) filtriert. Nach dem Auftragen wurde so lange mit Puffer A ohne NaCl gewaschen, bis alles ungebundene Material (keine Fraktionierung) von der Säule entfernt war. Anschließend wurde ein Stufengradient von 0-0,5 M NaCl angelegt. Das Elutionsprofil der radioaktiv markierten Proteine von Pool 1 ist in Abb. 8 gezeigt. Der Proteingehalt der Peak-Fractionen und des ungebundenen Materials wurde analog der S300-Trennung durch SDS-PAGE überprüft. In Abb. 9 sind die Proteine vom Ausgangsmaterial (Spur 1) des unfractionierten ungebundenen Materials (Spur 2) sowie der Peakfraktionen Nr. 8 (Spur 3) und Nr. 44 (Spur 4) gezeigt. Das 83 kDa Protein (Markierung *) bindet unter den gewählten Bedingungen nicht an die MQ-Säule (Spur 2) und kann in hoher Reinheit im sog. Durchlauf der Säule gefunden werden. Andere Peakfraktionen (Spuren 3, 4) enthielten noch mehrere Proteine.

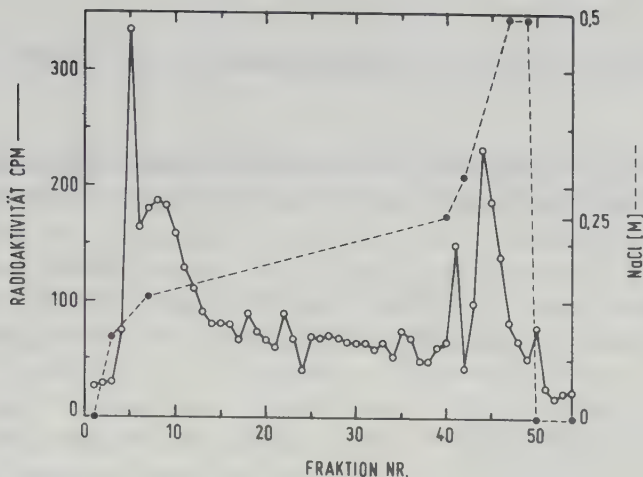


Abb. 8. Repräsentative Elutionsprofil einer Anionenaustauscher-Chromatographie vom Pool 1 (Abb. 6) an MQ mit einem Stufen-Gradienten von 0-0,5 M NaCl (s. gebrochene Linie). Unter den gewählten Elutionsbedingungen bindet das 83 kDa-Protein nicht an die MQ-Säule und wird im Durchlauf gefunden.

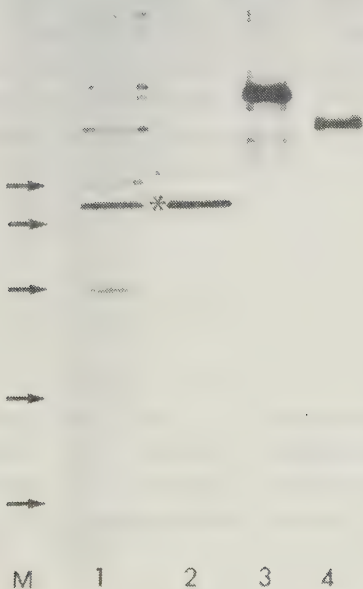


Abb. 9. Fluorogramm (nach SDS-PAGE) von der Isolierung des 83 kDa-Proteins aus Pool 1 (s. Abb. 6) über MQ (s. Abb. 7).

Spur 1: Das Ausgangsmaterial, Spur 2: das ungebundene Material aus dem Säulendurchlauf (s. *). Spuren 3 und 4: hier sind zur Demonstration die Trennung anderer Antigene aus den Fraktion 8 (Spur 3, ca. 195 kDa) und 44 (Spur 4, ca. 155 kDa) dargestellt. Die in diesen Fraktionen eluierten Proteine waren jedoch nicht rein. Molekulargewichtsmarker s. Abb. 4, ohne Cytochrom-c (12,3 kDa).

5) Elektro-Elution des 43 kDa-Proteins

Für die Isolierung des 43 kDa-Proteins wurde Gesamtmerozoiten-Extrakt (extrahiert in Triton X-100 oder NP-40) in der SDS-PAGE getrennt. Die 43 kDa-Proteinbande wurde nach Comassie Färbung aus dem Gel herausgeschnitten und elektro-eluiert (s. C. 10). Abb. 10, Spur 2 (Markierung ●) zeigt das isolierte Protein, nach Kontrolle in der SDS-PAGE.



Abb. 10. Isolierung des 43 kDa-Proteins über Elektro-Elution aus dem Gesamtmerozoiten-Extrakt (Fluorogramm nach SDS-PAGE).

Spur 1: Ausgangsmaterial, Spur 2: Re-elektrophorese des isolierten 43 kDa-Proteins (●). Molekulargewichtsmarker s. Abb. 4, ohne Cytochrom-c.

Von der geschätzten Ausgangsmenge von etwa 10 µg Protein pro Isolierung (Comassie-Färbung) wurde etwa 5 µg des Proteins nach Vergleich der Comassie-sichtbaren Banden in der SDS-PAGE zurückgewonnen. Für Immunisierungsversuche wurde jeweils das Protein aus drei Isolierungen zusammengefaßt und

weiter bearbeitet (s. C. 11. 1).

6) Immun-Reaktivität der 83- und 43 kDa-Proteine und die Gewinnung von polyvalenten Antiseren gegen die Proteine

Das mit chromatographischen Methoden (s. C. 6 und 7) isolierte 83 kDa, und das elektro-eluierte 43 kDa-Protein (s. D. 5) wurde mit OV-Antiserum immunpräzipitiert (Abb. 11), um zu klären, ob es sich bei diesen Proteinen um dieselben, bei der Isolierung unverändert erhaltenen 83- bzw. 43 kDa-Proteine handelt, welche bei Präzipitationen eines Gesamtmerozoiten-Extrakts mit OV-Antiserum (s. D. 2) präzipitiert werden. Das elektro-eluierte 43 kDa-Protein musste vor der Präzipitation gegen 0,1 M Tris/HCl, pH 8,0 dialysiert werden, um das SDS, das bei der Immunpräzipitation stört, weitgehend zu entfernen. Für die Intaktheit der isolierten Proteine sprechen die gebildeten starken Präzipitate. Das Ergebnis der Präzipitationen der isolierten Proteine mit humanem Normalserum ist in Abb. 11, Spuren 2 und 4 zu sehen. Daraus wird ersichtlich, daß die isolierten Proteine (Spur 1 und 3) spezifisch von OV-Antiserum erkannt worden sind. Auf Grund der Wanderungsgeschwindigkeit der beiden Proteine in der SDS-PAGE müssen sie als identisch mit den vor der Isolierung aus dem Detergenzextrakt identifizierten Antigenen angesehen werden.

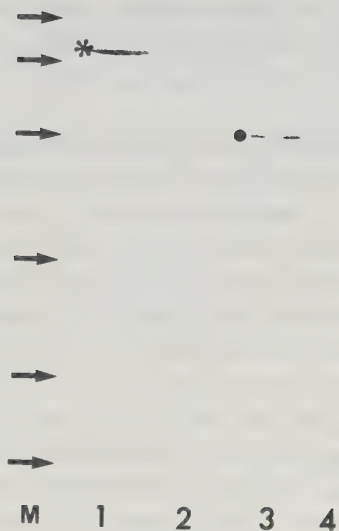


Abb. 11. Nachweis der Immun-Reaktivität der isolierten 83 kDa- und 43- kDa Proteine mit Hilfe von humanem Immenserum (OV-Antiserum).

Spur 1: Das isolierte 83 kDa-Protein (*) immunpräzipitiert mit OV-Antiserum,
 Spur 2: Kontrollpräzipitation des 83 kDa-Proteins mit normalem Humanserum (HS),
 Spur 3: Immunpräzipitation des isolierten 43 kDa-Proteins (●) mit OV-Antiserum,
 Spur 4: Kontrollpräzipitation des isolierten 43 kDa-Proteins mit HS. Molekulargewichtsmarker s. Abb. 4.

Das Protein, das in einem Volumen von etwa 15 ml Puffer A (83 kDa) bzw. 2 ml Elutionspuffer (43 kDa) enthalten war, wurde für die Immunisierung aufbereitet (s. C. 11. 1) und dem Kaninchen subcutan injiziert. Die gewonnenen Antiseren (A-83 und A-43) wurden sowohl durch Immunpräzipitation als auch im Immunoblot auf ihre Präzipitationsmuster geprüft. Die Immunpräzipitation des Merozoiten-Gesamtexttrakts mit A-83 (Abb. 12, Spur 2, Markierung *) zeigt eine starke Antigenbande bei 83 kDa. A-43 präzipitiert aus dem Gesamtmerozoiten-Extrakt ein einziges Protein (s. Abb. 12, Spur 4, Markierung ●) mit Molekulargewicht von 43 kDa.

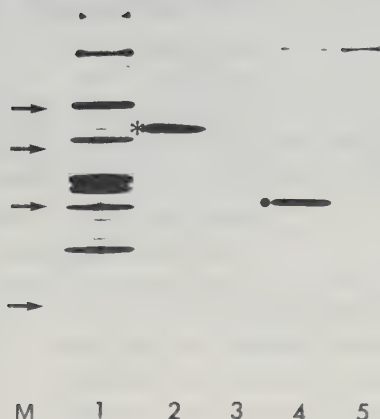


Abb. 12. Immunpräzipitation eines Triton X-100-Extraktes aus isolierten Merozoiten mit A-83 und A-43.

Spur 1: Merozoiten-Extrakt, Spur 2: Präzipitation des Extraktes mit dem spezifischen Antiserum (A-83) gegen das 83 kDa-Protein (*), Spur 3: Kontrollpräzipitation des Extraktes mit einem Kaninchen-Präimmunserum, Spur 4: Immunpräzipitation des Extraktes mit dem spezifischen Antiserum (A-43) gegen das 43 kDa-Protein (●) und Spur 5: Kontrollpräzipitation des Extraktes mit einem Kaninchen-Präimmunserum. Das ca. 150 kDa-Protein, das bei der Präzipitation mit A-43 erkannt wird, wird auch durch das Kontrollserum unspezifisch präzipitiert (Spur 5). Molekulargewichtsmarker, von oben nach unten: Phosphorylase b (97,4 kDa), Albumin (68 kDa), Ovalbumin (43 kDa) und Carbonanhydrase (30 kDa).

Der Immunoblot mit A-83 weist außer dem 83 kDa-Präzipitat ein weiteres bei 36 kDa auf (s. Abb. 13, Spur 1, Markierung ▼). A-43 reagiert auch im Immunoblot wiederum nur mit einem Protein (Abb. 13, Spur 3, Markierung ●).

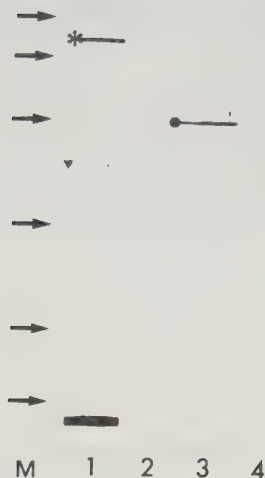


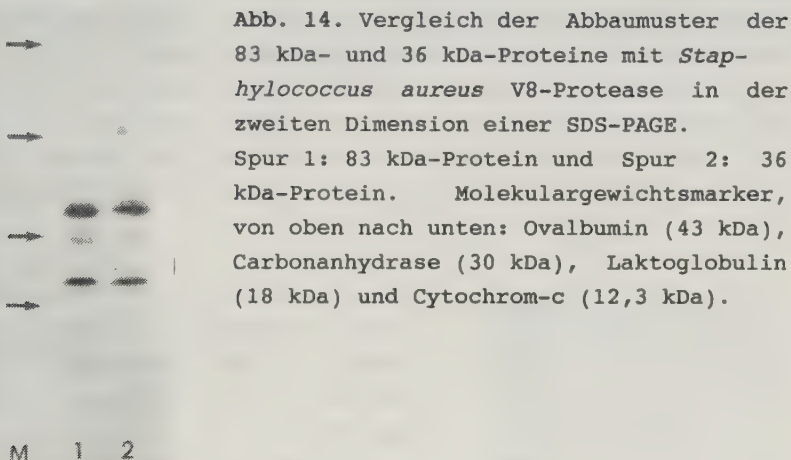
Abb. 13. Immunoblot eines Merozoiten-Extraktes mit A-83 und A-43. Spur 1: Inkubation mit A-83, Spur 2: Inkubation mit Kaninchen Präimmunserum, Spur 3: Inkubation mit A-43 und Spur 4: Inkubation mit Präimmunserum eines Kaninchens. A-83 erkennt zusätzlich ein 36 kDa-Protein (▼). Die schwarze Bande unten in Spur 1 markiert unspezifisch den Gelabschluß. Molekulargewichtsmarker s. Abb. 4.

7) Reinheit von A-83, gezeigt durch limitierte Proteolyse in der SDS-PAGE

Die Frage, ob es sich bei dem Präzipitationsprodukt von A-83 (s. D. 6, 36 kDa) um ein Abbau- bzw. Processing-Produkt handelt, oder ob das Antiserum mit Antikörpern, die gegen ein Fremdprotein gerichtet sind, verunreinigt war wurde durch Immunoblot nach limitiertem proteolytischen Abbau mit *Staphylococcus aureus* Protease V8 zu beantworten versucht. Hierzu wurde ein mit ³⁵S-Methionin markierter Gesamtmerozoiten-Extrakt in der SDS-PAGE aufgetrennt. Ein Gelsteifen wurde nach Transfer auf Nitrocellulose mit A-83 inkubiert und mit der alkalischen Phosphatasereaktion detektiert, und die Banden, die mit dem Antiserum eine Reaktion ergaben (83 kDa und 36 kDa), aus dem Rest-Gel herausgeschnitten. In der 2. Dimension wurden diese Gelstücke in einem weiteren

SDS-Gel (Acrylamidkonzentration 10-20 %) der limitierten Proteolyse mit V8-Protease unterworfen und die Spaltprodukte nach Fixierung und Fluorographie der Gele miteinander verglichen.

In Abb. 14 sind die Abbauprodukte von 83 kDa (Spur 1) und 36 kDa (Spur 2) nach Fluorographie der Nitrocellulose-Streifen gezeigt. Die Abbaumuster der 83- und 36 kDa-Proteine sind identisch.



Bei dem vom A-83 erkannten Protein (36 kDa) scheint es sich also entweder um ein Abbauprodukt des 83 kDa Proteins zu handeln, das während der Aufarbeitung des Merozoiten-Extraktes bzw. bei der Isolierung des 83 kDa Proteins entsteht, oder um ein Processing-Produkt, das man auch in vivo vorfinden würde, oder aber um ein Vorläufermolekül. Auszuschließen ist auch nicht die Möglichkeit, daß es sich bei dem 36 kDa-Protein um ein kreuzreagierendes Molekül handelt (s. Diskussion).

8) Affinitätschromatographische Isolierung von 83 kDa-Protein

Zusätzlich wurde versucht, das 83 kDa-Protein mittels Affinitätschromatographie (s. C. 11. 4. 2) zu reinigen. Als Antigenquelle diente ein nicht vorgetrennter Merozoiten-Extrakt, markiert mit ^{35}S -Methionin. Das an die A-83-Affinitätssäule gebundene Ausgangsmaterial wurde durch 2 M KSCN in Puffer A (s. auch C. 11. 4. 2) eluiert.

Bei der affinitätschromatographischen Isolierung des 83 kDa-Proteins wurden zwischen 0,15 und 0,3 % des Ausgangsmaterials an der Säule gebunden. In Abb. 15 ist das Ergebnis einer solchen Trennung zu sehen. Neben dem 83 kDa-Protein werden noch einige andere Proteine an der Säule zurückgehalten. Das gesuchte Protein ist jedoch nicht ganz quantitativ gebunden worden (s. Abb. 15, Spur 3).

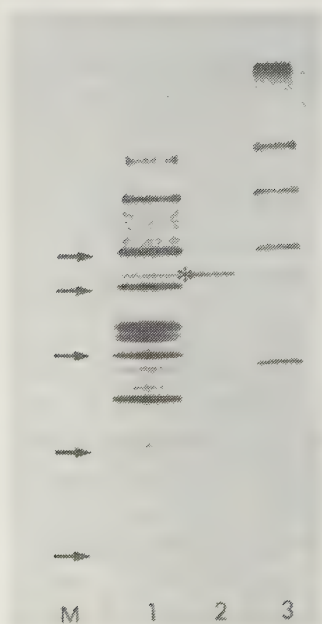
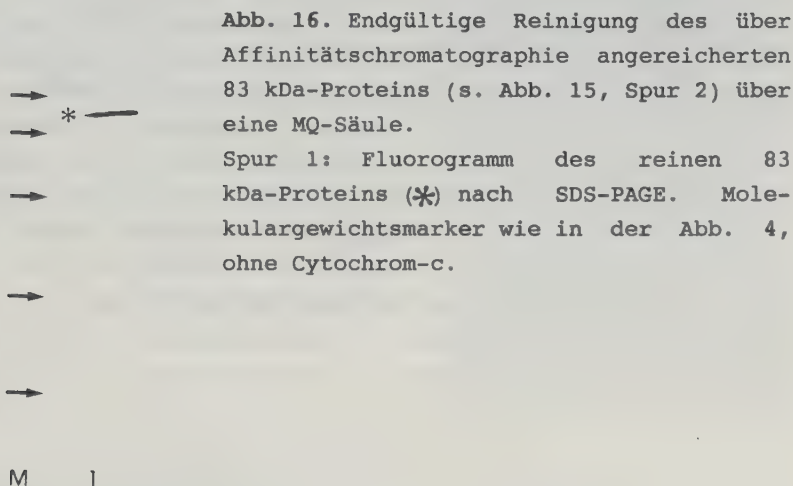


Abb. 15. Affinitätschromatographische Isolierung des 83 kDa-Proteins aus dem Gesamtmerozoiten-Extrakt (Fluorogramm nach SDS-PAGE).

Spur 1: Triton X-100-Extrakt von isolierten Merozoiten, Spur 2: das an A-83-Affinitätssäule gebundene Material und Spur 3: das nicht an diese Säule gebundene Material. Das 83 kDa-Protein (*) ist nicht quantitativ gebunden worden (s. Spur 3). Das von der Affinitätssäule eluierte Material (Spur 2) enthält noch ein Protein mit einem Molekulargewicht von etwa 40 kDa. Molekulargewichtsmarker s. Abb. 4, ohne Cytochrom-c.

Wie schon unter D. 4 beschrieben, wurde auch das so gewonnene Protein über MQ endgültig gereinigt, wobei das 83 kDa-Protein wieder nicht an die Säule gebunden wurde (s. Abb. 16). Durch FPLC an MQ gelang es sehr schnell, die noch vorhandenen Proteine zu entfernen.



9) Affinitätschromatographische Isolierung des 43 kDa-Proteins

Die Isolierung des nativen 43 kDa-Proteins erfolgte an einer A-43- Eupergit C- bzw. BrCN-aktivierten Sepharose Affinitätssäule. Von dem Merozoiten-Extrakt, das als Ausgangsmaterial diente, wurden etwa 0,2 % der radioaktiv markierten Proteine an die Säule gebunden.

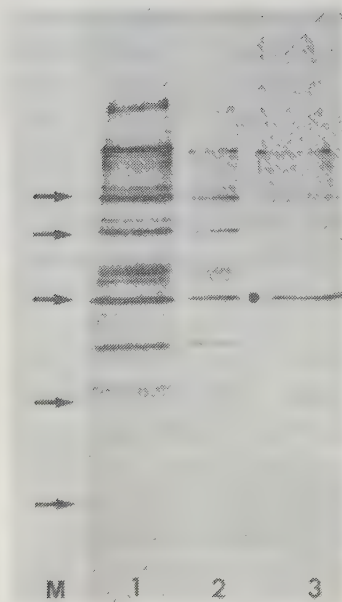


Abb. 17. Affinitätschromatographische Isolierung des 43 kDa Proteins (●) aus Merozoitengesamt-Extrakt über eine Eupergit C-A-43-Affinitätssäule (Fluorogramm nach SDS-PAGE).

Spur 1: Ausgangsmaterial, Spur 2: das nicht an die Säule gebundene Material, Spur 3: das an die A-43-Säule gebundene Material. Außer dem 43 kDa-Protein werden noch unspezifisch andere Proteine an die Säule gebunden (Spur 3). Molekulargewichtsmarker s. Abb. 4, ohne Cytochrom-c.

In der SDS-PAGE sieht man (Abb. 17, Spuren 2 und 3, Markierung), daß das 43 kDa-Protein neben einigen höhermolekularen Proteinen an der Säule haften geblieben ist. Die Bindung ist jedoch ebenfalls nicht quantitativ (Abb. 17, Spur 2). Endgültige Reinigung des 43 kDa-Proteins erfolgte wieder über MQ. Das gegen Puffer A dialysierte Material wurde auf die Säule aufgetragen und ein Stufengradient von 0 - 0.5 M NaCl angelegt (s. Abb. 18).

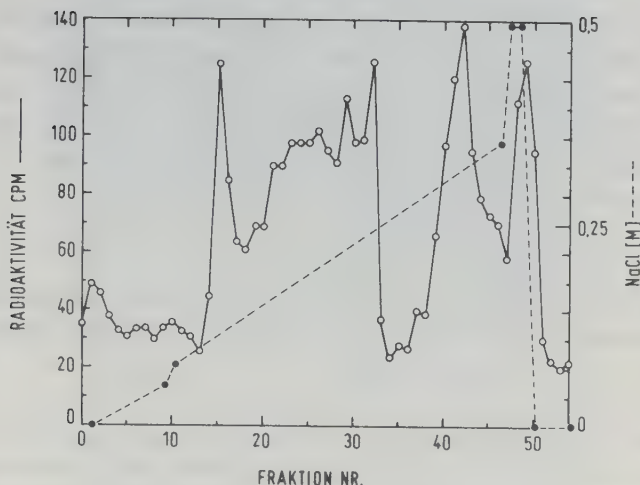


Abb. 18. Elutionsprofil einer MQ-Trennung von Material, das von einer A-43-Affinitätssäule eluiert wurde (s. Abb. 17, Spur 3). Der Stufengradient ist mit einer gebrochenen Linie gezeigt.

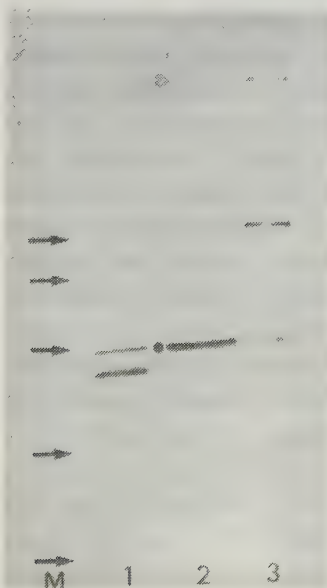


Abb. 19. Isolierung des 43 kDa-Proteins (●) aus dem an die A-43-Affinitätssäule gebundenen und eluierten Materials über MQ (Fluorogramm nach SDS-PAGE). Spur 1: Peakfraktion 15, Spur 2: Peakfraktion 42 und Spur 3: Peakfraktion 49. In den Fraktionen 41-44 (repräsentativ Fr. 42, Spur 2) war das 43 kDa-Protein rein. Die Fraktionen 15 (Spur 1) und 49 (Spur 3) demonstrieren die mit dem 43 kDa-Protein eluierten Polypeptide mit Molekulargewichten von ca. 40 kDa und 110 kDa. Molekulargewichtsmarker s. Abb. 4, ohne Cytochrom-c.

In Abb. 19 sind die eluierten Proteine in den Peakfraktionen 15, 42 und 49 zu sehen. Bei dem angelegten Gradienten wird das 43 kDa-Protein nicht in einem einzelnen Peak eluiert, sondern verteilt sich auf die Fraktionen 15 bis 49. Rein und ohne Begleitproteine findet man es jedoch nur in den Fraktionen 41-44.

10) Synthesezeitpunkt der 83- bzw. 43 kDa-Proteine; Identifizierung des Vorläuferproteins für das 83 kDa Molekül

Die nach D. 6 gewonnenen Antiseren A-83 und A-43 wurden zur Ermittlung des Synthesezeitpunktes, sowie zur Identifizierung des (der) eventuellen Vorläuferproteins(e) des 83 und 43 kDa-Moleküle verwendet.

Eine hochsynchrone Kultur mit 3 % Parasitämie wurde ab Trophozoitenstadium mit ^{35}S -Methionin markiert. Nach Entwicklung der Parasiten zu Ringstadien (Parasitämie etwa 30 %) wurde nochmals eine Sorbitolbehandlung durchgeführt (s. C. 2) und die parasitierten Zellen ohne Erythrozytenzugabe wieder (mit ^{35}S -Methionin) in die Kultur zurückgesetzt. Ab diesen Zeitpunkt (definiert als Zeit 0) wurden in Abständen von 0, 13, 20, 32, 37 und 42 Stunden Zellen aus der Kultur entnommen, ein 'Chase' mit zehnfachem Überschuß an unmarkiertem Methionin (0,013 mg/0,93 ml) über eine halbe Stunde durchgeführt und die Zellen anschließend mit MWP gewaschen und extrahiert (s. C. 3 und 5). In Abb. 20 ist die stadienspezifische Proteinsynthese der intraerythrozytären Parasiten gezeigt.

Ganz allgemein ist daraus zu sehen, daß die Syntheseaktivität vom Trophozoitenstadium (Stunde 32) bis zur Stunde 42 zur reifen Schizonten am stärksten ist.

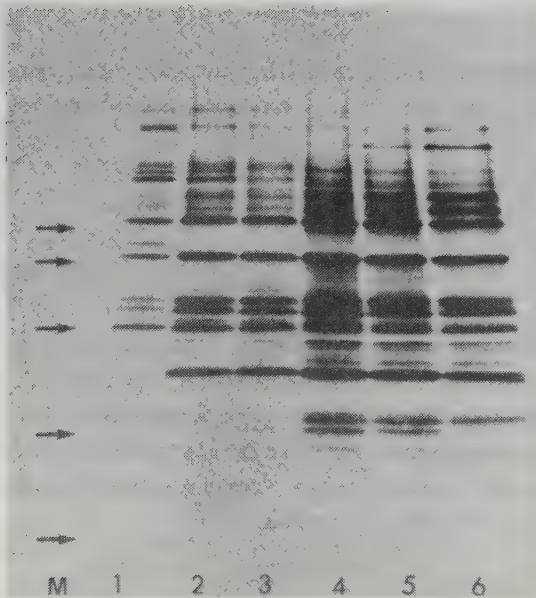


Abb. 20. Stadienspezifische Proteinsynthese der intraerythrozytären *P. falciparum*-Parasiten (Fluorogramm der Triton X-100-Extrakte nach SDS-PAGE).

Spur 1: Stunde 0, Spur 2: Stunde 13, Spur 3: Stunde 20, Spur 4: Stunde 32, Spur 5: Stunde 37 und Spur 6: Stunde 42. Erläuterungen s. Text. Molekulargewichtsmarker s. Abb. 4, ohne Cytochrom-c.

Die Großzahl der synthetisierten Proteine ist für alle Stadien identisch. Jedoch findet man auch Unterschiede. So findet man ein 132 kDa-Protein in Ring- und Trophozoiten-Stadium, dessen Gehalt aber bis zur Stunde 20 abnimmt, wonach es nicht mehr nachweisbar ist. Weiterhin findet man ab Stunde 32 ein 185 kDa-Protein, dessen Synthese bis zur Stunde 42 zunimmt. Zusätzliche Unterschiede gibt es in dem Syntheszeitpunkt der Proteine von Molekulargewichten 31 kDa, 36 kDa, 105 kDa, 120 kDa, 220 kDa und 270 kDa.

Für die Immunpräzipitationen der 83 kDa- bzw. 43 kDa-Antigene bzw. ihrer Vorläufer wurden aus den Antigen-Extrakten der Testzeit Stunde 0, 40.000 cpm und der Testzeiten Stunde 13, 20, 32, 37 und 42, 100.000 cpm mit 25 µl A-83 bzw. A-43

versetzt. Quantitative Präzipitation der Antigen-Antikörper Komplexe erfolgte mit 40 μ l Anti-Kaninchen-Serum vom Esel als zweitem Antikörper. Das Ergebnis der Immunpräzipitation mit A-83 ist in Abb. 21 und mit A-43 in Abb. 22 zu sehen. A-83 präzipitiert ab Trophozoitenstadium (h 32) ein 185 kDa-Protein, und die Stärke des Präzipitates nimmt bis zur Stunde 42 zu. Weiterhin präzipitiert das Antiserum ab Stunde 32 ein 36 kDa-Protein, dessen Gehalt von Stunde 37 bis zur Stunde 42 konstant bleibt. Dieses Protein ist schon zu den Zeitpunkten 0 und 13 vorhanden, jedoch in nur sehr geringen Mengen. A-83 präzipitiert außerdem etwas schwächer zwei weitere Proteine vom Molekulargewicht 120 kDa und 105 kDa. Das Auftreten dieser Proteine läuft parallel zu dem Erscheinen des 185 kDa-Proteins.

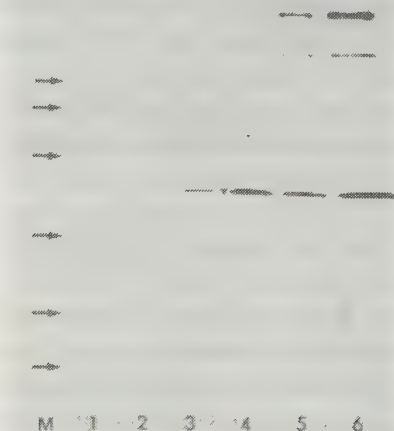


Abb. 21. Immunpräzipitation von stadienspezifischen Antigen-Extrakten der intraerythrozytären Parasiten mit A-83.

In den Spuren 1 bis 6 sind dieselben Extrakte präzipitiert, wie in Abb. 20 dargestellt. Ab Stunde 32 wird ein 185 kDa-Protein präzipitiert. Ein 36 kDa-Protein (▼) wird von A-83 ab jungen Trophozoiten-Stadien (Stunde 20) erkannt. Weitere Erläuterungen s. Text. Molekulargewichtsmarker s. Abb. 4.

Aus der Immunpräzipitation der stadienspezifischen Antigene mit A-43 (s. Abb. 22) geht hervor, daß das Protein in allen Stadien vorhanden ist, die Synthese des Proteins jedoch bis zur Stunde 42 zunimmt. Die schwachen Präzipitate der höhermolekularen Proteine kamen auch durch die Immunpräzipitationen der verschiedenen Stadien mit Präimmunserum zustande und müssen daher nicht als spezifisch angesehen werden (s. Abb. 22, Spur 7).

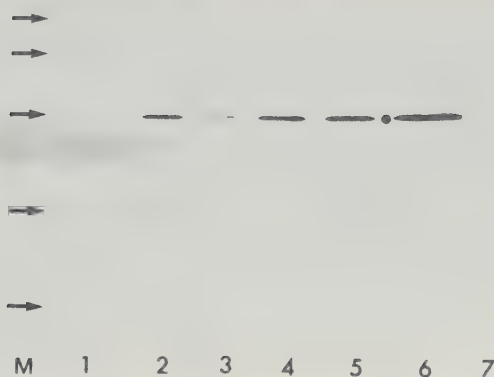


Abb. 22. Immunpräzipitation der stadienspezifischen Antigen-Extrakte mit A-43.

In den Spuren 1 bis 6 sind dieselben Extrakte präzipitiert, wie in Abb. 20 dargestellt. Das 43 kDa-Protein ist in allen Stadien nachweisbar (●). Spur 7: Kontrollpräzipitation des Antigen-Extraktes von Stunde 42 (repräsentativ für alle Stadien) mit Präimmunserum. Molekulargewichtsmarker s. Abb. 4, ohne Cytochrom-c.

11) Lokalisation der 83- bzw. 43 kDa-Proteine auf der Oberfläche der Merozoiten

11. a) durch Immunoblot von ^{125}J -markierten Merozoiten-Proteinen

Nach Laktoperoxidase katalysierter Jodierung von *P. falciparum* Merozoiten (s. C. 4) findet man 5(6) Proteine (s. Abb. 23, Spur 1) mit Molekulargewichten von 83 kDa, (67 kDa), 43 kDa, 38 kDa, 36 kDa und 20 kDa. Es hat sich im Laufe der Versuche gezeigt, daß es sich bei dem 67 kDa-Protein, das nicht in allen Präparationen vorhanden war, um Serumalbumin handelte.

^{125}J -markierte Merozoiten wurden im Immunoblot gegen A-83 bzw. A-43, und mit Peroxidase-konjugiertem Anti-Kaninchen-IgG vom Schwein als zweitem Antikörper getestet (s. Abb. 23, Spuren 2 und 4). Mit A-83 führen zwei Proteine des in der SDS-PAGE getrennten Merozoiten-Extrakts zu einer positiven Reaktion (Abb. 23, Spur 2). A-43 reagiert mit einem Protein (Abb. 23, Spur 4).

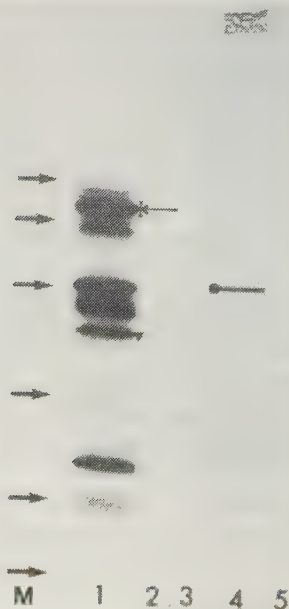


Abb. 23. Nachweis der 83 kDa- und 43 kDa-Merozoiten-Antigene als Merozoiten-Oberflächenproteine.

Spur 1: Triton X-100-Extrakt von oberflächenjodierten Merozoiten-Proteinen, Spur 2: Immunoblot dieses Extraktes mit A-83, Spur 4: Immunoblot dieses Extraktes mit A-43, Spuren 3 und 5: die jeweiligen Kontrollen mit einem Präimmunserum des jeweiligen Kaninchens. Das Serumalbumin aus dem Kulturmedium (67 kDa, Spur 1) ist nicht völlig gewegewaschen worden und wird auch markiert. Molekulargewichtsmarker s. Abb. 4.

Zum Nachweis, ob es sich bei diesen Proteinen um eines der Oberflächenproteine (s. Abb. 23, Spur 1) handelt, wurde die Nitrozellulose getrocknet und autoradiographiert. Es konnte eindeutig gezeigt werden, daß sowohl das 83 und 36 kDa als auch das 43 kDa-Protein identisch mit dem jeweiligen 83, 36 bzw. 43 kDa-Protein nach Oberflächenjodierung ist.

11. b) durch indirekte Immunfluoreszenz (IFA)

Nach mehreren Vorversuchen wurde gefunden, daß für die IFA ein leichtes Fixieren der Merozoiten mit 1 % Formaldehyd (v/v) die geeignetste Methode darstellt. In Abb. 24a) ist das Ergebnis für A-83 und Abb. 24b) für A-43 gezeigt.

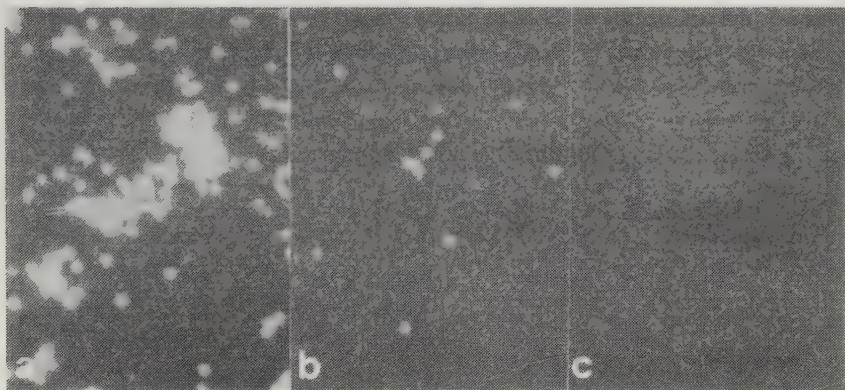


Abb. 24. Nachweis der Lokalisation des 83 kDa- und 43 kDa-Proteins in den Merozoiten durch IFA.

a) Inkubation der Merozoiten mit A-83, b) Inkubation mit A-43 und c) Inkubation mit einem Präimmunserum. A-83 markiert den ganzen Merozoiten, jedoch ist eine Konzentration der Fluoreszenz an der Membran (s. Pfeile) zu beobachten. Die Fluoreszenz nach Inkubation mit A-43 ist etwas schwächer (Abb. 24b), muß jedoch im Vergleich zum Kontrollserum (Abb. 24c) als eine positive Reaktion bewertet werden. Vergrößerung: 1600 fach.

Wegen der geringen Größe der Merozoiten ($2 \times 1,5 \mu\text{m}$) ist eine lichtmikroskopische Beurteilung der Merozoiten auch nach der stärksten Vergrößerung unmöglich. Jedoch scheint die Fluoreszenz im Falle von A-83 sich über die Oberflächenmembran des Parasiten zu erstrecken (Abb. 24a, Pfeile). A-43 ergibt eine schwächere Fluoreszenz als A-83 (Abb. 24b), die Membranen werden aber auch hier etwas stärker markiert. Im Vergleich zum Kontrollserum (Abb. 24c) müssen die Reaktionen beider Antiseren als spezifisch beurteilt werden.

11. c) durch Immunelektronenmikroskopie (IEM)

Mit der sehr empfindlichen Methode der IEM wurde die genaue Lage der 83 kDa- und 43 kDa-Proteine in den Merozoiten untersucht. Eine Herabsetzung unspezifischer Bindungen wurde durch Optimierung der Antikörperverdünnung (1:1500 für A-83 und 1:250 für A-43) sowie durch Verwendung von BSA (s. C. 12. b) erreicht.

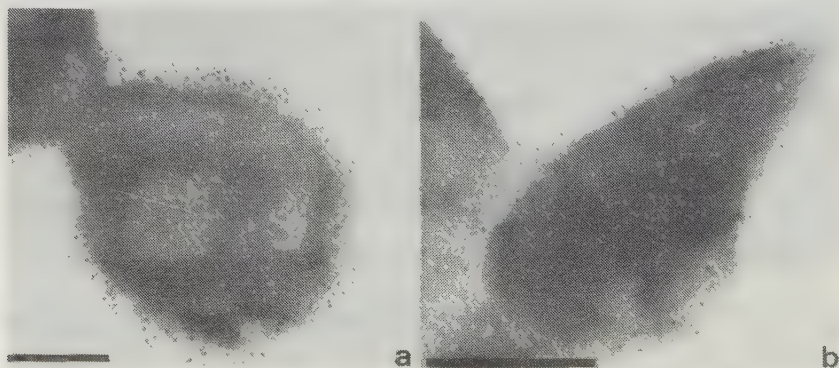


Abb. 25. Nachweis der Lokalisation des 83 kDa- und 43 kDa-Proteins auf der Oberfläche der Merozoiten mit Hilfe von IEM.

a) Inkubation der isolierten Merozoiten mit A-83, b) Inkubation der Merozoiten mit A-43. Sowohl A-83 als auch A-43 markieren deutlich den Oberflächencoat der Merozoiten. Vergrößerung: 38.000 fach, Markierungsstrich: $0,5 \mu\text{m}$.

In Abb. 25a ist ein Merozoit nach IEM, inkubiert mit A-83, zu sehen. Die Gold-Partikel (10 nm) sind gleichmäßig über die ganze Merozoitenoberfläche verteilt. Interne Bereiche des Parasiten werden nicht markiert.

Die immunelektronenmikroskopischen Untersuchungen mit A-43 ergaben ebenfalls eine spezifische Bindung der Immunglobuline bzw. der Gold-Partikel an die Merozoiten-Oberfläche, allerdings mit einer wesentlich geringeren Dichte und bei einer wesentlich geringeren Verdünnung des Antiserums als bei A-83 Präparat (s. Abb. 25b).

12) Die Beteiligung der 83-bzw. 43 kDa-Proteine am Invasionsprozeß

Nachdem es sich bei dem 83 kDa- und dem 43 kDa-Antigenen um Oberflächenproteine der Merozoiten handelt (s. D. 11), wurde die mögliche Beteiligung der Proteine am Invasionsprozeß der Merozoiten in die roten Blutkörperchen untersucht. Bei einer Abhängigkeit der Invasion von diesen Proteinen müßte sich die Invasionsrate, nach Neutralisation durch den spezifischen polyklonalen Antikörper, erniedrigen. Da jedoch nicht auszuschließen ist, daß eine zurückgegangene Invasionsrate von einer toxischen Wirkung von Fremdproteinen im Testsystem herrührt, wurde ein Testsystem verwendet, das zwischen invasions-inhibierender und zwischen toxischer Wirkung differenziert. Dies wurde dadurch erreicht, daß der Antikörper entweder nur während der Invasion, oder aber nach der Invasion während der erneuten Entwicklung zu reifen Parasiten den Kulturen zugegeben wurde. Als Vergleich diente der Einbau von ^3H -Hypoxanthin, wobei als 100 %iges Wachstum der ^3H -Hypoxanthin-Einbau ohne Antikörper-Zugabe (NK) angesehen wurde. Zur Vermeidung des Einflusses zusätzlicher Fremdproteine des Serums wurde der Test nur mit gereinigten Immunglobulinfraktionen durchgeführt. Als positive Kontrolle des Testsystems diente OV-Antiserum, als negative Kontrolle ein normales Kaninchen Serum (NS). In der Tabelle I sind die

Einbauraten von Kulturen mit OV, NS, A-83 und A-43 prozentual zur NK wiedergegeben.

TABELLE I

Inhibition von Merozoiten-Invasion in vitro (in Prozent) durch gereinigte IgG-Fraktionen von Kaninchen-Immunseren (A-83, A-43), Kaninchen Normalserum (NK) und humanem Immunserum (OV). Die unterschiedlichen IgG-Konzentrationen (zwischen 7,8 $\mu\text{g/ml}$ bis 1mg/ml) wurden nur während des Invasionsvorganges der Kultur zugegeben.

μg IgG pro ml

End-Volumen: 1000 500 250 125 62,5 31,25 15,6 7,8

% Invasions-Inhibition

A-83	13	9	7	5	3	2	1	-
A-43	23	15	11	5	3	-	-	-
OV	46	15	10	7	-	-	-	-
NS	11	9	7	2	1	1	-	-

Bei Konzentrationen von 1 mg/ml erreicht OV eine Inhibitionsrate von 46 % , bei 500 und 250 $\mu\text{g/ml}$ entsprechend 15 bzw. 10 % . Bei einer Konzentration von 1 mg/ml findet man bei NS und A-83 Inhibitionsraten von 11 bzw. 13 % . Niedrigere Antikörperkonzentrationen führen zu einer Inhibition von 9 bzw. 7 % . A-43 zeigt eine invasions-inhibierende Wirkung von 23 % bei einer IgG-Konzentration von 1 mg/ml, weiterhin 15 % bei 500 $\mu\text{g/ml}$ und 11 % bei 250 $\mu\text{g/ml}$. Untersucht man die toxische Wirkung der Antikörper, sieht man, daß sowohl NS als auch A-83 Toxizitätsraten von mehr als 20 % erreichen (s. Tabelle II). Bei der entsprechenden Antikörperkonzentration haben OV und A-43 dagegen nur eine toxische Wirkung von 17 % .

TABELLE II

Inhibition von Parasiten-Wachstum in vitro (in Prozent) durch die gereinigten IgG-Fraktionen von A-83, A-43, Kaninchen-Kontrollserum (NK) und humanem Immunsrum (OV). Die Immunglobuline waren während des ganzen intraerythrozytären Zyklus in der Kultur vorhanden.

µg IgG pro ml

End-Volumen: 1000 500 250 125 62,5 31,25 15,6 7,8

% Wachstums-Hemmung

A-83	27	8	4	3	-	-	-	-
A-43	17	3	2	2	-	-	-	-
OV	17	5	4	2	-	-	-	-
NS	27	12	2	1	-	-	-	-

Daraus kann man den Schluß ziehen, daß A-83 im Verhältnis zum Kontrollserum keine erhöhte invasions-inhibierende Wirkung besitzt. Vielmehr scheinen die Antikörper bei den untersuchten Konzentrationen eher leicht toxisch zu wirken. A-43 dagegen inhibiert den Invasionsvorgang der Merozoiten in die roten Blutkörperchen.

E. DISKUSSION

Aufgabenstellung

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war es, das 83 kDa Processing-Produkt des Schizonten-spezifischen Proteins P190/195 mittels konventioneller chromatographischer Trennverfahren, und außerdem ein immunogenes 43 kDa-Protein durch Elektro-Elution zu isolieren. Mit Hilfe der gegen diese beiden isolierten Proteine gewonnenen Antikörper sollten die Antigene immunologisch charakterisiert werden. Darüber hinaus sollte Antigenmaterial für weiterführende Experimente (z.B. für Lymphozyten-Stimulierung in der Zellkultur und Vakzinierungen im Primatenmodell) bereitgestellt werden.

Notwendigkeit zur Isolierung nativer Proteine aus Parasiten

Aufgrund der Tatsache, daß man Plasmodien-Antigene in ausreichenden Mengen für z.B. Immunisierungs-Experimente zur Verfügung haben muß, versuchen zahlreiche Arbeitsgruppen, verschiedene Polypeptide mit Hilfe gentechnologischer oder peptidsynthetischer Verfahren zu produzieren. Das zur Zeit am weitestgehendst erforschte plasmodiale Protein ist das Sporozoiten-Oberflächen-Antigen, welches aus verschiedenen *P. falciparum* Arten und Stämmen in *E. coli* kloniert wurde. Vergleichende Untersuchungen der Nukleotidsequenzen, die für das Oberflächenprotein der Sporozoiten verschiedener Malariasträmme kodieren, ergaben, daß die entsprechenden Oberflächenproteine repetitive Aminosäuresequenzen enthalten, die zwar innerhalb der Arten variieren, jedoch in den verschiedenen Stämmen konserviert sind (Zavala et al., 1985b; Young et al., 1985). Diese 'Repeat'-Strukturen sind immundominante Epitope, d.h. alle bisher untersuchten monoklonalen Antikörper binden in diesem Bereich des Proteins (Dame et al., 1984; Nussenzweig und Nussenzweig, 1986). Immunisierungsversuche sowohl mit einem in *E. coli*

exprimierten Fusionskonstrukt (Young et al., 1985) als auch mit einem synthetisch hergestellten 'Repeat'-Peptid aus der Sequenz des *P. falciparum* Sporozoiten-Oberflächen-Proteins (Ballou et al., 1985; Zavala et al., 1985a) in Mäusen und in Kaninchen erbrachten einen hohen Antikörpertiter. Diese Antikörper inhibierten in vitro den Invasionsvorgang der Sporozoiten in die Leberzellen (Zavala et al.; 1985a; Mazier et al., 1986). Diese positiven Ergebnisse konnten jedoch bis jetzt weder in *Aotus*-Affensystem noch im Humansystem bei freiwilligen Versuchspersonen bestätigt werden (Chulay, 1986). Dies zeigt einerseits, wie schwierig es ist, die Ergebnisse, die man in vitro gewinnt, auf das Tiermodell oder auf den Menschen zu übertragen, zeigt andererseits aber auch, daß synthetische oder gentechnologisch hergestellte Peptid- und Proteinsequenzen einer kritischen Betrachtung unterliegen müssen. Posttranslationale Modifikationen (wie Acylierung, Methylierung, Glykosylierung) können immunologisch wichtige Gruppen eines natürlichen in vivo-Proteins bilden, die jedoch den in bakteriellen Expressionssystemen hergestellten Proteinen fehlen. Es können z.B. Zuckerseitenketten nicht nur die Konformation eines Proteins beeinflussen, sondern auch als potentielle Antikörper-Bindungsstellen dienen (z.B. Blutgruppen-Antigene).

Zum heutigen Zeitpunkt wurde nur vereinzelt (Vermeulen et al., 1983; Shamansky et al., 1985; Thelu et al., 1985) über Proteinisolierung direkt aus dem Malariaparasiten mittels konventioneller biochemischer Trennverfahren berichtet. In anderen Studien geschieht die Isolierung nativen Proteinmaterials fast ausschließlich über Affinitätschromatographie mit an BrCN-aktivierte Sepharose gebundenen mono- bzw. polyklonalen Antikörpern. Die zur Anwendung kommenden polyklonalen Antikörper sind gegen ursprünglich mit monoklonalen Antikörpern affinitätschromatographisch isolierte Proteine gerichtet (Holder und Freeman, 1984; Perrin et al., 1985). Neben den geringen Ausbeuten, die mit den im laborüblichen Maßstab hergestellten affinitätschromato-

graphischen Säulen erzielt werden können, muß auch mit unspezifischen oder Kreuz-Reaktionen der Antigene mit dem Trägermaterial gerechnet werden. Ein weiterer Nachteil ist das häufig zum Eluieren verwendete chaotrope Agens KSCN, welches stark denaturierend wirken kann.

Ein mit dieser Strategie isoliertes Plasmodien-Antigen ist das Schizonten-spezifische Protein von *P. falciparum* P190/195, das erstmals von Holder und Freeman (1982) beschrieben wurde. Dieses Protein ist ein Glykoprotein (Pirson und Perkins, 1985; Howard et al., 1985). Im Laufe der Merozoiten-Freisetzung aus den reifen Schizonten wird das P190/195 zu verschiedenen niedermolekularen Proteinen 'processiert', die später im Merozoiten lokalisiert werden können. Mit Hilfe von monoklonalen Antikörpern wurden drei Haupt-Processing-Produkte, mit Molekulargewichten von 83 kDa, 42 kDa und 19 kDa identifiziert (Holder und Freeman, 1984; McBride und Heidrich, 1987). Das 42 kDa- sowie das 19 kDa-Produkt waren glykosyliert, in dem 83 kDa-Protein konnten jedoch keine Zuckeranteile nachgewiesen werden (Howard et al., 1985). Die Untersuchungen mit allen bisher verwendeten Immunseren zeigten, daß das P190/195-Protein eine starke humorale Immunantwort hervorrief und aus diesem Grund als potentiell protektives Antigen in Frage kommt. Für in vitro und in vivo Experimente standen bis jetzt die Processing-Produkte des P190/195 nicht im nativen Zustand zur Verfügung. Daher sollte die native Isolierung des 83 kDa-Processing-Produkts aus P190/195 (unter Verwendung von konventionellen chromatographischen Verfahren) vorgenommen werden. Zum Vergleich wurde ein weiteres immunogenes Merozoiten-Antigen, das 43 kDa-Protein, in teilweise denaturiertem Zustand (nach SDS-PAGE und Elektro-Elution) isoliert.

Zur Isolierung der 83 kDa- und 43 kDa-Proteine

Das 83 kDa-Protein wurde durch Gelchromatographie an

Sephacryl S300 und anschließender Anionenaustausch-Chromatographie an MQ gereinigt. Die Reinheit des nicht an die MQ-Säule gebundenen 83 kDa-Proteins wurde durch SDS-PAGE (Comassie- oder Silber-Färbung) und anschließender Fluorographie der Gele gezeigt. Ausgehend von etwa 5-10 mg Gesamtmerozoiten-Extrakt konnten etwa 20-40 µg des reinen Proteins, also etwa 0,2-0,4 % gewonnen werden. Das Ergebnis war reproduzierbar, was nicht zuletzt auf das automatische, programmierbare FPLC-System zurückgeführt werden muß.

Aufgrund der Zeitaufwendigkeit der gelchromatographischen Trennungen (hier 40 h) könnte eine in vitro Proteolyse begünstigt werden, besonders, da die Plasmodien über eine Reihe z.T. noch nicht genau definierter Proteasen verfügen. Um dieser Tendenz entgegenzuwirken, wurde allen Pufferlösungen ein Cocktail aus Proteaseblockern (PMSF, PCMB, Pepstatin, Bestatin, Antipain) zugefügt. Auch nach dieser Vorsichtsmaßnahme kann man nicht sicher sein, daß unspezifische oder unbekannte Proteasen beim Isolierungsprozeß noch aktiv sind und Spaltprodukte bilden.

Nach Gewinnung des spezifischen Antiserums wurde die Möglichkeit einer rascheren Isolierung durch Affinitätschromatographie untersucht, jedoch konnte das Protein nie in einem einzigen Trennschritt rein gewonnen werden, da immer unspezifisch andere Proteine in Wechselwirkung mit dem Säulenmaterial traten. Kreuzreaktionen, die durch das Vorhandensein von gemeinsamen Epitopen, möglicherweise in den bei Plasmodien ausgeprägten 'Repeat'-Strukturen zustande kommen, könnten hierfür eine Erklärung sein (Anders, 1986; Buranakitjaroen und Newbold, 1987). Diese, das 83 kDa-Polypeptid verunreinigenden Proteine, konnten durch anschließende FPLC-Chromatographie an MQ entfernt werden. Die Bindung des 83 kDa-Proteins an das Immunoadsorbens war nicht quantitativ. Dies beruhte offensichtlich auf der zu geringen Säulenkapazität (5 mg gebundenes IgG pro ml Säulenmaterial), die wegen des wertvollen, nur in beschränkter Menge vorhandenen Immunsersums nicht erhöht

werden konnte. Ausgehend von max. 5 mg Gesamtmerozoiten-Extrakt wurden Ausbeuten von 0,15-0,3 % des reinen 83 kDa-Proteins erzielt. Die Ausbeuten des nach Gel- und Anionenaustausch-Chromatographie bzw. Affinität- und Anionenaustausch-Chromatographie isolierten Proteins waren fast identisch. Die durch Anwendung von chaotropen Reagentien (z.B. KSCN) nicht unbegrenzt verwendbaren Immunaффinitätssäulen scheinen jedoch für die präparative Isolierung des 83 kDa-Proteins nicht geeignet zu sein. Auch die unspezifisch gebundenen Polypeptide stellen in diesem Falle ein Problem dar.

Das 43 kDa Merozoiten-Protein, das ebenfalls durch humanes Immunsérum präzipitiert wird, wurde über Elektro-Elution isoliert. Der quantitative Vergleich der Comassie-sichtbaren Banden vor und nach der Isolierung in der SDS-PAGE ergab einen Verlust von etwa 50 % während der Isolierungsschritte. Der Verlust muß auf die, nicht vollständige Eluierbarkeit des Proteins aus dem Gel oder aber auf das Festhaften des elektroeluierten Materials am Dialyseschlauch, welcher das Elutionsgefäß vom Puffersystem trennt, zurückgeführt werden. Zur Isolierung des 43 kDa-Proteins in einer nicht durch SDS und β -Mercaptoäthanol denaturierten Form wurde ebenfalls versucht, das Protein mittels Affinitätschromatographie zu reinigen. Es traten dabei dieselben, wie schon bei der affinitätschromatographischen Isolierung des 83 kDa-Proteins gefundenen Schwierigkeiten auf, d.h. unspezifische Bindung von Fremdproteinen an das Säulenmaterial. Bei Anwendung von Eupergit C statt BrCN-aktivierte Sepharose Cl-4B konnten zum Teil die unspezifischen Bindungen reduziert, jedoch nicht gänzlich beseitigt werden. Auch in einem anschließenden Anionenaustausch-Schritt konnten sowohl durch lineare als auch durch Stufengradienten die begleitenden Proteine nicht entfernt werden und das 43 kDa-Protein nicht in einem einzelnen Peak eluiert werden. Bis 0,2 M NaCl war das verunreinigende Protein von einem Molekulargewicht von 40 kDa, von 0,45 bis 0,5 M NaCl ein Protein von 110 kDa. Dies könnte daraufhin weisen, daß das 43 kDa-Protein im Komplex

mit einem 40 kDa- und einem 110 kDa-Protein vorliegt. Rein war das 43 kDa-Protein in den Fraktionen bei 0,3 bis 0,34 M NaCl. Die Methode der Affinitätschromatographie kann in diesem Falle daher nur zur Gewinnung des Proteins für analytische Zwecke dienen.

Gegen beide isolierten Proteine wurde ein polyklonales Antiserum in Kaninchen gewonnen und die Spezifität der Antiseren im Immunoblot und durch Immunpräzipitation getestet. A-43 reagierte in beiden Testsystemen spezifisch nur mit einem Protein von 43 kDa, was eine Voraussetzung für weitere Experimente wie Affinitätschromatographie (s. oben), IFA und IEM war. A-83 präzipitierte in der klassischen Immunpräzipitation, bei der das Antigen in nativer Form vorliegt, aus dem Merozoiten-Gesamtextrakt ausschließlich ein Protein von 83 kDa und aus dem Schizonten-Extrakt das Vorläuferprotein P190/195 (s. unten). Im Immunoblot dagegen, in welchem das Antigen im denaturierten, reduzierten Zustand eingesetzt wird, erkannte das A-83 Serum noch ein weiteres Polypeptid mit einem Molekulargewicht von 36 kDa. Antikörpertiter für A-83 und A-43 wurde nicht bestimmt. Routinemäßige Verdünnung der Seren auf 1:100 und 1:200 führte in beiden Fällen zu starken Präzipitationen. Auch in einer Verdünnung von 1:800 war eine deutliche, wenn auch schwächere Reaktion mit den Seren zu sehen (nicht gezeigt). Dies bedeutet, daß sowohl das säulenchromatographisch isolierte native 83 kDa-Antigen als auch das elektroeluierte z. T. denaturierte 43 kDa-Antigen eine gleich starke Immunantwort im Kaninchen hervorrufen.

Zur Lokalisation des 83 kDa- und des 43 kDa-Proteine auf der Oberfläche von *P. falciparum* Merozoiten

Die Lokalisation der 83 kDa- und 43 kDa-Proteine im Merozoiten wurde mit Hilfe von IFA, IEM und Immunoblot der mit ¹²⁵J-markierten Oberflächenproteine untersucht. Beide Proteine konnten als Oberflächen-Antigene der Merozoiten

charakterisiert werden.

In der IFA markiert das spezifische Antiserum gegen das 83 kDa-Protein den ganzen Merozoiten, wobei eine Konzentrierung der Fluoreszenz an die Zellmembranbereiche beobachtet werden kann. Die IEM zeigt eindeutig, daß das 83 kDa-Protein auf der Merozoiten-Oberfläche lokalisiert ist. Nach der Verteilung der Protein A-Gold Partikel scheint sich das Protein im 'coat' des Parasiten zu befinden (s. Abb. 25a). Das gleiche Ergebnis wurde durch Analyse der Oberflächenproteine mit A-83 erhalten: Nach der Oberflächenjodierung von Merozoiten, anschließender Auftrennung der jodierten Antigene, und einem Immunoblot erkennt das spezifische Antiserum A-83 eindeutig das 83 kDa-Molekül als Oberflächenprotein, des weiteren noch ein 36 kDa-Protein.

Durch die Verwendung von mono- bzw. polyklonalen Antikörpern gegen das Vorläuferprotein P190/195 ist das 83 kDa-Protein als ein Oberflächenprotein von Merozoiten diskutiert worden (Holder und Freeman, 1984; Hall et al., 1984). Die Anwendung des polyklonalen Antikörpers gegen das isolierte 83 kDa-Protein und besonders die hier gezeigten morphologischen Analysen bestätigen sowohl immunologisch als auch morphologisch diese Befunde eindeutig.

Die Bindung des spezifischen Antikörpers gegen das 43 kDa-Protein an die Merozoiten ruft in der IFA eine schwache, jedoch eindeutig positive Reaktion hervor. In der IEM wird ersichtlich, daß das 43 kDa-Protein auf der Merozoiten-Oberfläche lokalisiert ist. Im Immunoblot von ^{125}J -markierten Oberflächenproteinen wird spezifisch das 43 kDa-Protein erkannt. Die Gründe für die, im Gegensatz zu A-83, schwächeren Reaktionen des A-43 in der IFA und IEM (s. C. 12. b, Verdünnung 1:250) könnten in der Struktur des dort vorliegenden nativen 43 kDa-Proteins liegen. Da das Antiserum gegen ein elektro-eluiertes d.h. ein z.T. denaturiertes Protein gerichtet ist, ist es möglich, daß ein Teil der Immunglobuline mit Epitopen reagiert, die im

nativen Molekül, (und diese sind sowohl in IFA als auch in IEM vorhanden), den Antikörpern nicht zugänglich sind. Erst nach Denaturierung (s. Immunoblot) oder Detergenz-Behandlung (s. Immunpräzipitation eines Merozoiten-Extraktes) werden diese Determinanten zugänglich gemacht. Eine andere Erklärung wäre, daß das 43 kDa-Protein auf der Oberfläche von Merozoiten in geringerer Dichte vorhanden ist als das 83 kDa-Protein.

Synthesezeitpunkt für das Vorläufermolekül des 83 kDa-Antigens und für das 43 kDa-Protein

Mehrere Autoren berichten über stadienspezifische Proteinsynthese der intraerythrozytären *P. falciparum* Parasiten (Kilejian, 1980; Perrin et al., 1981; Brown et al., 1982; Deans et al., 1983; Yamaga et al., 1984). In Ring- und jungen Trophozoiten-Stadien wurde eine geringe Syntheseaktivität für Proteine beobachtet, erst ab dem mittleren bis reifen Trophozoiten-Stadium stieg die Einbaurrate von radioaktiv markierten Aminosäuren und blieb bis zur Reifung der Parasiten hoch (eigene Ergebnisse, s. unten; Perrin et al.; 1981; Deans et al.; 1983). Es konnte gezeigt werden (Yamaga et al., 1984), daß es keine qualitativen Unterschiede in der Syntheseaktivität von in vitro kultivierten und direkt aus dem Wirtstier (*Aotus*) isolierten Parasiten gibt. Weiterhin wurde die Synthese von neuen, hauptsächlich hochmolekularen Proteinen am Ende der intraerythrozytären Entwicklungsperiode beobachtet (Kilejian, 1980; Brown et al., 1982; Deans et al., 1983). Diese Ergebnisse konnten auch bei dem in vorliegender Arbeit verwendeten *P. falciparum*-Stamm FCB1 nach der radioaktiven Markierung der erythrozytären Stadien bestätigt werden. Außer der Synthese einiger weniger Proteine (132 kDa im Ring- und Trophozoiten-Stadium und 31 kDa, 36 kDa, 105 kDa, 120 kDa, 185 kDa, 220 kDa und 270 kDa in reifen Trophozoiten- und Schizonten-Stadien) waren die gefundenen Unterschiede bei den meisten nachgewiesenen Proteine in der

einfachen Gelelektrophorese hauptsächlich quantitativer Natur.

Bei der Immunpräzipitation des Antigen-Extraktes der verschiedenen intraerythrozytären Stadien mit A-83 wird ab Trophozoiten-Stadium (32 h) ein 185 kDa-Protein erkannt. Die Synthese dieses Vorläuferproteins für das 83 kDa-Polypeptid nimmt mit der Reifung der Schizonten zu. Das 83 kDa-Protein tritt erst in den Merozoiten auf, und ist in Schizonten noch nicht nachweisbar, ein Beweis, daß es ein Processing-Produkt sein muß. Ein weiterer Beweis dafür, daß das 83 kDa-Protein vom P190/195 abstammt, wurde durch Ansequenzierung des 83 kDa-Proteins gebracht (Strych, Miettinen-Baumann, Lottspeich, Heidrich., Parasitol. Res. in Druck). Die gefundene Sequenz des 83 kDa-Proteins (V-T-H-E-S-Y-Q-E-L-V) ist identisch mit der von Holder et al. (1985) veröffentlichten Signal-Sequenz in der N-terminalen Ende des P190/195. Das Molekulargewicht des Schizonten-spezifischen Proteins P190/195 wird in der Literatur unterschiedlich mit 185 kDa bis 200 kDa angegeben. Dies kann einerseits auf Unterschieden zwischen den Stämmen und Klonen von *P. falciparum* (McBride et al., 1985) beruhen, andererseits aber auch auf die Verwendung von verschiedenen Molekulargewichtsmarkern (Spektrin oder Myosin) zurückgeführt werden. Das bereits öfters erwähnte 36 kDa-Protein, das wahrscheinlich im Merozoiten-Extrakt in nur geringer Konzentration vorhanden ist, wird in den intraerythrozytären Parasiten (Trophozoiten-Stadium, deutlich ab Stunde 20 bis zu reifen Schizonten) durch A-83 präzipitiert.

Die Immunpräzipitation der Antigen-Extrakte aus verschiedenen erythrozytären Stadien mit A-43 zeigt, daß das 43 kDa-Protein nicht stadienspezifisch ist. Es wird während des ganzen intraerythrozytären Zyklus synthetisiert. Schwach nachweisbar ist es nur in Ring-Stadien, was eventuell auf den niedrigen ³⁵S-Methionin Einbau und die geringe Proteinsyntheserate in diesen Stadien beruht. Ebenfalls können in den intraerythrozytären Parasiten des FCB1-Stammes von *P. falciparum* keine Vorläufer- bzw. Abbauprodukte für

das 43 kDa-Protein nachgewiesen werden. Perrin et al. (1985) haben ein 41 kDa-Protein aus *P. falciparum* untersucht, das sie über Affinitätschromatographie und Elektro-Elution isolierten. Sie fanden heraus, daß die Synthese des Proteins nicht stadienspezifisch ist. Die Autoren haben jedoch dieses Protein in den Rhoptries nachgewiesen (Perrin et al., 1985), während das in vorliegender Arbeit isolierte 43 kDa-Antigen eindeutig auf der Merozoitenoberfläche lokalisiert ist. Dies schließt eine Identität beider Proteine aus.

Zur Funktion der 83 kDa- und 43 kDa-Proteine

Auf Grund der Beobachtung, daß viele Immunseren aus endemischen Gebieten die Invasion und das Wachstum der Merozoiten bzw. der erythrozytären Stadien in vitro inhibieren (Brown et al., 1982; Coppel et al., 1984; Wählin et al., 1984; Berzins et al., 1986), ist ein solches Testsystem geeignet, Hinweise auf eine mögliche protektive Wirkung eines bestimmten Proteins beim Einsatz des entsprechenden Antikörpers zu liefern. Diese Antikörper können z.B. in Wechselwirkung mit den, aus Schizonten freiwerdenden Merozoiten treten und eine Agglutination der Merozoiten zur Folge haben (Vernes et al., 1984; Marsh et al., 1986). Die Merozoiten/Erythrozyten-Interaktion kann somit direkt durch Neutralisation von für die Invasion wichtigen Epitopen verhindert werden (Epstein et al., 1981; Vernes et al., 1984). Desweiteren kann z.B. die Bindung von Antikörpern an die Außenseite der Zellwand einer parasitierten Wirtszelle die Kommunikation der Zelle mit der umgebenden Milieu erschweren und so zu einer Wachstums-Hemmung führen (Wählin et al., 1984).

Beim Einsatz des spezifischen Antikörpers gegen das 83 kDa-Protein in dem in vitro-Test kann nach den vorliegenden Ergebnissen keine invasions-inhibierende bzw. wachstumshemmende Wirkung nachgewiesen werden. Daraus kann man folgern, daß das 83 kDa-Protein nicht direkt am Invasionsvorgang

beteiligt ist. Dies kann andererseits aber bedeuten, daß die gegen das 83 kDa-Protein gerichteten Antikörper, die in humanen Immunseren gefunden werden, eine Hemmung von anderen wichtigen Funktionen des Parasiten bewirken können, möglicherweise über die Stimulierung der zellulären Immunabwehr. Auch durch die Beobachtungen anderer Autoren, die keine Korrelation von Resultaten aus in vitro Testsystem und in vivo gefundenem protektiven Status nachweisen konnten (Dubois et al., 1983; Brown et al., 1983; Fandeur et al., 1984), wird diese Annahme unterstützt. An thymektomierten Mäusen, die nicht mehr in der Lage waren, eine Malaria-Infektion zu überleben (Weinbaum et al., 1976; Cavacini et al., 1986), wurde gezeigt, daß eine zell-gebundene Immunität bei der Abwehr der Malaria eine Rolle spielt. Eine starke Proliferation von T-Zellen wurde auch nach Immunisierung von Mäusen mit synthetischen 'Repeat'-Peptiden von *P. falciparum* Sporozoiten-Oberflächen-Antigen beobachtet (Togna et al., 1986). In vitro Versuche zeigten, daß alle diese 'Repeat'-Peptide eine Aktivierung von T-Helfer-Zellen hervorriefen, was die Bedeutung der T-Zellen bei der Stimulierung einer humoralen Abwehr unterstreicht (Togna et al., 1986). Für eine ähnliche Aktivierung von T-Zellen könnten die, im N-terminalen Abschnitt des 83 kDa-Proteins gefundenen, 'Repeat'-Strukturen (Holder et al., 1985) verantwortlich sein. Auch wenn das 83 kDa-Protein selbst nicht direkt an der Invasion teilnimmt, kann es doch allein oder im Komplex mit anderen Merozoiten-Proteinen für die Erkennung der Wirtszelle oder Festhaftung an sie verantwortlich sein. Mit Hilfe proteolytischer Enzyme könnten die für die Invasion zuständigen Determinanten im Laufe des Processings von P190/195 zugänglich gemacht werden. Die Tatsache, daß Protease-Inhibitoren die Invasion reduzieren oder ganz verhindern, könnte als diesbezüglicher Hinweis gedeutet werden (Hadley et al., 1983; Dluzewski et al., 1986). Wegen seiner Lokalisation im 'coat' könnte das 83 kDa-Protein auch als Strukturprotein dienen, das den Merozoiten und seine 'wichtigen' Antigene schützend umgibt. Bei Invasion würden diese 83 kDa-Strukturen, die nach außen

gerichtet sind, abgeworfen, sodaß nur die funktionellen Bereiche der P190/195 Processing-Produkte und die Bereiche, die in der Membran verankert sind, mit in die Wirtszelle aufgenommen werden. Für einen solchen Prozeß könnte die Tatsache sprechen, daß das 83 kDa-Protein im Kulturmedium und im Patienten-Serum gefunden werden kann (Perrin und Dayal, 1982).

Untersucht man dagegen die Wirkung des spezifischen Antikörpers gegen das 43 kDa-Protein in vitro, kann eine Inhibition der Invasion beobachtet werden. Für die inhibierende Wirkung sind jedoch relativ hohe Antikörperkonzentrationen, sowohl beim positiven Kontrollserum, als auch bei A-43 notwendig. Die Gründe dafür sind unbekannt. Eine Erklärung könnte sein, daß das Antiserum das native Molekül in situ und in vitro nicht eindeutig zu erkennen vermag. Auch für die schwachen Reaktionen in der IFA und IEM (s.oben) kann dieser Umstand verantwortlich sein. Mehrere Autoren berichten über die Notwendigkeit hoher Antikörperkonzentrationen in vitro (Brown et al., 1982; Wählin et al., 1984; Newbold, 1984). Bis zu 5 mg/ml IgG aus humanen Immunseren waren erforderlich, um eine Wachstums-Hemmung in vitro hervorzurufen (Brown et al., 1982). Vierzigfach effektiver waren spezifische Immunglobuline gegen Malaria-Antigene im in vitro-Test (Wählin et al., 1984). Dieselben Autoren vermuteten, daß die zusätzlichen, nicht-spezifischen Immunglobuline aus dem Serum sogar eine unspezifische Stimulierung des Parasiten-Wachstums bei höherer IgG-Konzentrationen bewirken könnten.

Wegen der invasions-inhibierenden Wirkung des A-43 muß für das 43 kDa-Protein eine Funktion bei der Merozoiten/Erythrozyten-Interaktion in Betracht gezogen werden. Die nicht sehr hohe inhibierende Wirkung könnte darauf beruhen, daß noch andere Proteine für den Invasionsvorgang benötigt werden, sodaß A-43 allein keine vollständige Hemmung bewirken kann, sondern nur für einen Teilprozeß des komplexen Invasionsvorganges verantwortlich ist.

Ungeklärte Herkunft des 36 kDa-Proteins

Mehrmals in der Arbeit wurde ein 36 kDa-Antigen erwähnt, das durch A-83 unter z.T. denaturierenden Bedingungen im Immunoblot erkannt wird. Die das 36 kDa-Protein betreffenden experimentellen Ergebnisse sind teilweise widersprüchlich, teilweise auch nicht erklärbar. Es stellt sich die Frage, ob es sich bei dem 36 kDa-Protein um ein Processing-Produkt, oder aber um ein proteolytisches Spaltprodukt handelt. Letzteres könnte erst im Laufe der Merozoiten-Aufbereitung durch *in vitro* Proteolyse entstehen, da unbekannte Proteaseaktivitäten trotz des verwendeten Proteaseblocker-Cocktails nicht ausgeschlossen werden können (s. oben). Das 36 kDa-Protein wurde bei der Jodierung der Merozoiten markiert. Dies bedeutet, daß falls es sich beim 36 kDa-Protein um ein Proteolyse-Produkt handelt, die Proteolyse nach der Laktoperoxidase katalysierten Jodierung der Oberflächenproteine stattgefunden haben muß. Falls das 36 kDa-Protein aber ein Processing-Produkt des 83 kDa-Proteins ist, ist es als solches auf der Merozoiten-Oberfläche vorhanden.

Die Peptidmuster von 83 kDa- und 36 kDa-Proteine nach limitierter enzymatischer Spaltung mit *Staphylococcus aureus* Protease V8 in der SDS-PAGE zeigten eine deutliche Übereinstimmung. Es bleibt jedoch offen, warum die nicht-homologen Teilstücke des 83 kDa-Antigens, die nach der bekannten Nucleotid-Sequenz des P190/195 vorhanden sein müssen (Holder et al., 1985), nach dem Protease-Abbau nicht nachgewiesen werden können.

Wie bereits erwähnt, wird das 36 kDa-Protein bei der Immunpräzipitation eines Merozoiten-Extraktes durch A-83 nicht erkannt (jedoch im Immunoblot). Eine Erklärung könnte eine zu geringe Konzentration des Proteins im Merozoiten-Gesamtextrakt sein. Durch Immunoblotting kann eine spezifische Anreicherung von Proteinen erreicht werden, die in geringen Mengen vorhanden sind.

Das 83 kDa-Protein ist als eines der endgültigen natürlichen Processing-Produkte des P190/195 beschrieben worden (Freeman und Holder, 1983), ein 36 kDa-Antigen wurde in diesen Arbeiten nicht gefunden. Da die Autoren in ihren Untersuchungen einen monoklonalen Antikörper gegen das Vorläuferprotein benutzt haben (der auch das 83 kDa-Protein erkennt), ist es durchaus möglich, daß (wegen der Spezifität des monoklonalen Antikörpers) das 36 kDa-Protein nicht nachgewiesen werden kann, da das entsprechende Epitop nicht im Sequenzbereich des 36 kDa-Polypeptids liegt. Weiterhin haben die zitierten Autoren bei ihren Versuchen auch nur die normale Immunpräzipitation und nicht zusätzlich ein Immunoblot verwendet. McBride et al. (1985) haben die Schizonten-spezifischen Proteine aus verschiedenen *P. falciparum*-Stämmen mit Hilfe von monoklonalen Antikörper untersucht. Sie fanden ein niedermolekulares Protein von MG 30-33 kDa, und vermuteten, daß es sich bei diesem Protein um ein stammspezifisches Fragment aus P190/195 handelt.

Das 36 kDa-Protein wurde bei der stadienspezifischen Immunpräzipitation von Ring- bis Schizonten-Stadien durch A-83 erkannt. Dieses Ergebnis spricht gegen eine 36 kDa Spaltprodukt, das in Laufe der Merozoiten-Aufarbeitung durch Proteolyse entsteht. Da das 36 kDa-Protein in seiner immunogenen Struktur mit dem 83 kDa-Polypeptid zusammenhängen muß, könnte es sein, daß in der Zelle ein ständiger Abbau des Vorläuferproteins, hier des 185 kDa, stattfindet. Bei der Immunpräzipitation mit A-83 würde man unter Umständen nur das Endprodukt vom Abbau des 83 kDa-Moleküls nachweisen können. Unwahrscheinlich ist es, daß das 36 kDa-Protein als Vorstufe für das hochmolekulare 185 kDa-Protein dient. Dieses würde homologe Sequenzbereiche in den, von Holder und Freeman (1982) beschriebenen Processing-Produkten mit den Molekulargewichten von 83 kDa, 42 kDa und 19 kDa voraussetzen. Das spezifische Antiserum gegen das 83 kDa-Protein erkennt jedoch in der Immunpräzipitation des Merozoiten-Extrakts keines der weiteren Processing-Produkte.

Das 36 kDa-Antigen könnte möglicherweise auch ein stadienspezifisches, kreuzreagierendes Molekül sein, wie sie immer häufiger bei *P. falciparum* gefunden werden (Anders, 1986; Buranakitjaroen und Newbold, 1987).

Ausblick

Die Komplexität des Malaria-Parasiten wird es auch in der nahen Zukunft sehr schwierig machen, einen Impfstoff gegen diese Krankheit zu entwickeln. Es müssen sowohl die verschiedenen Stadien (Gametozyten, Sporozoiten, Merozoiten, intraerythrozytäre Parasiten) und Stämme mit ihrer antigenen Unterschiedlichkeit, aber auch die Fähigkeit des Parasiten, Antigen-Varianten auszubilden, berücksichtigt werden. Den meisten Erfolg würde wahrscheinlich ein Impfstoff haben, der verschiedene Polypeptide aus verschiedenen Stadien enthält, welche wiederum konservative Molekülstrukturen innerhalb der Polypeptidketten beinhalten. Wegen ihrer Eigenschaft als Merozoiten-Oberflächen-Proteine, die eine Stimulierung der humoralen Abwehr im Menschen hervorrufen, kommen die beiden in vorliegender Arbeit untersuchten Proteine (83 kDa und 43 kDa) als Kandidaten für einen solchen Impfstoff in Frage. Die das Eindringen der Merozoiten in die roten Blutkörperchen hemmende Wirkung des 43 kDa-Proteins konnte in vitro nachgewiesen werden. Ob eine solche 'Protektion' auch in vivo mit einem im denaturierten Zustand isolierten Protein erzielt werden kann, bedarf weiterer Untersuchungen. Ein 41 kDa-Protein, das in denaturiertem Zustand von anderen Autoren isoliert wurde, erbrachte zwar hohe Antikörpertiter in *Saimiri*-Affen, der protektive Charakter der Antikörper war aber gering (Perrin et al., 1985). Da die Immunisierung von Affen mit diesem 41 kDa-Protein, allerdings über Affinitätschromatographie im nativen Zustand isoliert, die Ausbildung einer Protektion gegen die Malaria hervorrief (Perrin et al., 1985), könnte der strukturelle Zustand des Proteins von entscheidender Bedeutung sein. Für das 83 kDa-Protein konnte eine invasionshemmende Wirkung in vitro

nicht gefunden werden, und es müssen weitere Experimente, eventuell in einer Lymphozyten-Kultur in vitro, oder aber im Primatenmodell in vivo folgen, um die mögliche Beteiligung des 83 kDa-Antigens an der Stimulierung der zellulären Immunabwehr zu untersuchen. In vitro Lymphozyten-Testsysteme sind von mehreren Autoren ausgearbeitet worden (Troye-Blomberg et al., 1984; Ballet et al., 1985; Bygbjerg et al., 1986), die möglicherweise für die weiteren Experimente an den 83 kDa- und 43 kDa-Proteinen anwendbar wären. Die Rückschläge bei der Immunisierung von Mäusen mit synthetischen Peptiden, die nicht von allen Tieren gleichermaßen akzeptierte T-Zellen-Erkennungsgruppen enthielten (Good et al., 1986), lassen die weitere Forschung mit gereinigten Proteinen in vitro und in vivo als dringend notwendig erscheinen.

F. ZUSAMMENFASSUNG

1. Aus Merozoiten von *P. falciparum* (FCB1-Stamm) wurde ein 83 kDa-Protein mittels konventioneller chromatographischer Methoden in nativer Form, und ein 43 kDa Protein durch Elektro-Elution nach SDS-PAGE, isoliert.

2. Durch Immunpräzipitations-Experimente eines Gesamtmerozoiten-Extraktes mit einem Pool aus humanen Immunsereen (aus Burkina Faso/Obervolta) wurde gezeigt, daß das 83 kDa- und das 43 kDa-Protein eine humorale Immunantwort in vivo stimulieren.

3. Spezifische Antiseren (A-83 und A-43 benannt) gegen diese beiden isolierten Proteine wurden in Kaninchen gewonnen.

4. Mit Hilfe der spezifischen Antikörper wurden das 83 kDa- und 43 kDa-Protein zusätzlich affinitätschromatographisch gereinigt.

5. Immunpräzipitationen des Merozoiten-Extraktes mit den spezifischen Antiseren gegen die 83 kDa- und 43 kDa-Proteine führten in beiden Fällen jeweils zu einem einzigen Präzipitat mit einem Molekulargewicht von 83 kDa bzw. 43 kDa. Im Immunoblot erkannte A-43 wiederum nur ein Protein von einem Molekulargewicht von 43 kDa, A-83 jedoch noch ein zusätzliches Protein von einem Molekulargewicht von 36 kDa.

6. Durch indirekten Immunfluoreszenz-Test, Immunelektronenmikroskopie und Immunoblot von ^{125}J -markierten Oberflächenproteinen der Merozoiten konnte gezeigt werden, daß sowohl das 83 kDa- als auch das 43 kDa-Protein auf der Oberfläche der Merozoiten lokalisiert ist.

7. Durch Immunpräzipitations-Experimente mit A-83 von Antigen-Extrakten, die aus synchronisierten Kulturen zu verschiedenen Zeiten des 48-Stunden Zyklus gewonnen wurden,

wurde gezeigt, daß das 83 kDa-Protein aus einem Vorläufermolekül von 185 kDa gebildet wird, das in Schizonten-Stadien vorhanden ist. A-83 präzipitierte außerdem aus den Antigen-Extrakten der Ring-Stadien das in 5. beschriebene 36 kDa-Protein.

8. Immunpräzipitations-Experimente mit A-43 von den, zu verschiedenen Zeiten des intraerythrozytären Zyklus gewonnenen Antigen-Extrakten bewiesen, daß das 43 kDa-Protein nicht stadienspezifisch ist. Weiterhin konnten keine Vorläufer- bzw. Abbauprodukte des 43 kDa-Polypeptids nachgewiesen werden.

9. Die gereinigten Immunglobuline gegen das 43 kDa-Protein bewirkten eine Hemmung der Merozoiten-Invasion in vitro. Dieses legt eine mögliche Beteiligung des 43 kDa-Proteins beim Invasionsvorgang nahe.

10. Durch Invasions-Inhibitions-Experimente konnte für das 83 kDa-Protein keine invasions-inhibierende Wirkung in vitro nachgewiesen werden. Auf Grund der Lokalisation des 83 kDa-Proteins im 'coat' des Merozoiten kann das Protein als Strukturprotein dienen, das den Merozoiten schützend umgibt. Da das Protein in den intraerythrozytären Parasiten nicht nachgewiesen werden kann, wird es während der Invasion abgeworfen.

11. Ein 36 kDa-Protein wurde durch A-83 aus dem Merozoiten-Gesamtextrakt im Immunoblot erkannt. Da die Ergebnisse bezüglich dieses Proteins sich teilweise widersprechen (s. Kap. D), können keine Aussagen zur Herkunft (Processing- bzw. Proteolyse-Produkt oder ein kreuzreagierendes Antigen) oder zur Bedeutung des 36 kDa-Proteins gemacht werden.

12. Auf Grund der gewonnenen Daten kann die Isolierung von Malaria-Antigenen über konventionelle chromatographische Verfahren in nativer Form bzw. über Elektro-Elution in z.T. denaturierter Form erfolgreich durchgeführt werden. Die

Bereitstellung solcher Antigene für Vakzinierungs-Experimente im Tiermodell bzw. für in vitro Stimulierungs-Experimente in Lymphozyten-Zellkulturen ist notwendig. Solche Experimente können wertvolle Erkenntnisse für die Entwicklung eines Impstoffes gegen die Malaria liefern.

G. LITERATUR

- AIKAWA, M., MILLER, L. H., JOHNSON, J., RABEGGE, J. (1978). Erythrocyte entry by malaria parasite. J. Cell. Biol. 77:72-82.
- ALEY, S. B., SHERWOOD, J. A., HOWARD, R. J. (1984). Knob-positive und knob-negative *Plasmodium falciparum* differ in expression of a strain-specific malarial antigen on the surface of infected erythrocytes. J. Exp. Med. 160:1585-1590.
- ALLISON, A. C., EUQUI, E. M. (1983). The role of cell-mediated immune responses in resistance to malaria, with special reference to oxidant stress. Ann. Rev. Immunol. 1:361-392.
- ANDERS, R.F. (1986). Multiple cross-reactivities among antigens of *Plasmodium falciparum* impair the development of protective immunity against malaria. Parasit. Immunol. 8:529-539.
- BALLET, J. J., DRUILHE, P., VASCONCELOS, I., SCHMITT, C., AGRAPART, M., FROMMEL, D. (1985). Human lymphocyte responses to *Plasmodium falciparum* merozoite antigens. A functional assay of protective immunity? Trans. R. Soc. Med. Hyg. 79:497-499.
- BALLOU, W. R., ROTHBARD, J., WIRTZ, R. A., GORDON, D. M., WILLIAMS, J. L., GORE, R. W., SCHNEIDER, I., HOLLINGDALE, M. R., BEAUDOIN, R. L., MALOY, W. L., MILLER, L. H., HOCKEMEYER, W. T. (1985). Immunogenicity of synthetic peptides from circumsporozoite protein of *Plasmodium falciparum*. Science 228:996-999.
- BERZINS, K., PERLMANN, H., WÄHLIN, B., CARLSSON, J., WAHLGREN, M., UDOMSANGPETCH, R., BJÖRKMAN, A., PATARROYO, M. E., PERLMANN, P. (1986). Rabbit and human antibodies to a repeated amino acid sequence of a *Plasmodium falciparum* antigen, Pf 155, react with the native protein and inhibit merozoite invasion. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83:1065-1069.
- BRADFORD, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal. Biochem. 72:248-254.
- BROWN, K. N., BROWN, I. N. (1965). Immunity to malaria: antigenic variation in chronic infections of *Plasmodium knowlesi*. Nature 208:1286-1288.
- BROWN, G. V., ANDERS, R. F., MITCHELL, G. F., HEYWOOD, P. F. (1982). Target antigens of purified human immunoglobulins which inhibit growth of *Plasmodium falciparum* in vitro. Nature 297:591-593.

BROWN, G. V., COPPEL, R. L., VRBOVA, H., GRUMONT, R. J., ANDERS, R. F. (1982). *Plasmodium falciparum*: comparative analysis of erythrocyte stage-dependent protein antigens. *Exp. Parasitol.* 53:279-284.

BROWN, G. V., ANDERS, R. F., KNOWLES, G. (1983). Differential effect of immunoglobulin on the in vitro growth of several isolates of *Plasmodium falciparum*. *Infect. Immun.* 39:1228-1235.

BROWN, G. V., CULVENOR, J. G., GREWTH, P. E., BIANCO, A. E., COPPEL, R. L., SAINT, R. B., STAHL, H.-D., KEMP, D. J., ANDERS, R. F. (1985). Localisation of the ring-infected erythrocyte antigen (RESA) of *Plasmodium falciparum* in merozoites and ring-infected erythrocytes. *J. Exp. Med.* 162:774-779.

BURANAKITJAROEN, P., NEWBOLD, C. I. (1987). Antigenic cross reactivity between p195 and a distinct protein of 100 kDa in *Plasmodium falciparum*. *Mol. Biol. Parasitol.* 22:65-77.

BYGBJERG, I. C., JEPSEN, S., THEANDER, T. G. (1986). Lymphocyte response to purified *Plasmodium falciparum* antigens during and after malaria. *Acta Tropica* 43:55-62.

CAVACINI, L. A., LONG, C. A., WEIDANZ, W. P. (1986). T-cell immunity in murine malaria: adoptive transfer of resistance to *Plasmodium chabaudi adami* in nude mice with splenic T-cells. *Infect. Immun.* 52(3):637-643.

CHEUNG, A., SHAW, A. R., LEBAN, J., PERRIN, L. H. (1985). Cloning and expression in *Escherichia coli* of a surface antigen of *Plasmodium falciparum* merozoites. *The EMBO Journal* 4(4):1007-1012.

CHULAY, J. (1986). Clinical Trials Experience - WRAIR. USAID - Conference on Malaria in Africa; Practical considerations of vaccine(s) and clinical trials, December 1-4, 1986, Washington, D. C. USA.

CLEVELAND, D. W., FISCHER, S. G., KIRSCHNER, M. V., LAEMMLI, U. K. (1977). Peptide mapping by limited proteolysis in sodium dodecyl sulfate and analysis by gel electrophoresis. *J. Biol. Chem.* 252:1102-1106

CLYDE, D. L., MOST, H., MCCARTHY, V., VANDERBERG, J. P. (1973). Immunization of man against sporozoite induced *falciparum* malaria. *Am. J. Med. Sci.* 226:166-177.

COLLINS, W. E., ANDERS, R. F., PAPPAIOANOU, M., CAMPBELL, G. H., BROWN, G. V., KEMP, D. J., COPPEL, R. L., SKINNER, J. C., ANDRYSIAK, P. M., FAVALORO, J. M., CORCORAN, L. M., BRODERSON, J. R., MITCHELL, G. F., CAMPBELL, C. C. (1986). Immunization of Aotus monkeys with recombinant proteins of an erythrocyte surface antigen of *P. falciparum*. *Nature* 323:259-262.

COPPEL, R. L., COWMAN, A. F., LINGELBACH, K. R., BROWN, G. V., SAINT, R. B., KEMP, D. J., ANDERS, R. F. (1983). Isolate-specific S-antigen of *Plasmodium falciparum* contains a repeated sequence of eleven amino acids. *Nature* 306:751-756.

COPPEL, R. L., BROWN, G. V., MITCHELL, G. F., ANDERS, R. F., KEMP, D. J. (1984). Identification of a cDNA-clone encoding a mature blood stage antigen of *Plasmodium falciparum* by immunization of mice with bacterial lysates. *The EMBO Journal* 3(2):403-407.

COPPEL, R. L., COWMAN, A. F., ANDERS, R. F., BIANCO, A. E., SAINT, R. B., LINGELBACH, K. R., KEMP, D. J., BROWN, G. V. (1984). Immune sera recognize on erythrocytes a *Plasmodium falciparum* antigen composed of repeated amino acid sequences. *Nature* 310:789-791.

COWMAN, A. F., SAINT, R. B., COPPEL, R. L., BROWN, G. V., ANDERS, R. F., KEMP, D. J. (1985). Conserved sequences flank variable tandem repeats in two S-antigen genes of *Plasmodium falciparum*. *Cell* 40:775-783.

DAME, J. B., WILLIAMS, J. L., McCUTCHAN, T. F., WEBER, J. L., WIRTZ, R. A., HOCKEMEYER, W. T., MALOY, W. L., HAYNES, J. D., SCHNEIDER, I., ROBERTS, D., SANDERS, G. S., REDDY, E. P., DIGGS, C. L., MILLER, L. H. (1984). Structure of the gene encoding the immunodominant surface antigen on the sporozoite of the human malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Science* 225:593-599.

DEANS, J. A., THOMAS, A. W., INGE, P. M. W., COHEN, S. (1983). Stage-specific protein synthesis by asexual blood stage parasites of *Plasmodium falciparum*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 8:45-51.

DLUZEWSKI, A. R., RANGACHARI, K., WILSON, R. J. M., GRATZER, W. B. (1986). *P. falciparum*: protease inhibitors and inhibition of erythrocyte invasion. *Exp. Parasitol.* 62:416-422.

DUBOIS, P., PAULLIAC, S., FANDEUR, T., DEDET, J.-P., PEREIRA da SILVA, L. (1983). Characterization of protective antigens from erythrocytic stages of *Plasmodium falciparum*. *J. Cell. Biochem. Suppl* 7A:12

EATON, M. D. (1938). The agglutination of *P. knowlesi* by immune serum. *J. Exp. Med.* 67:857-869.

ENEA, V., ELLIS, J., ZAVALA, F., ARNOT, D. E., ASAVANICH, A., MASUDA, A., QUAKYI, I., NUSSENZWEIG, R. S. (1984). DNA-cloning of *Plasmodium falciparum* circumsporozoite gene: amino acid sequence of repetitive epitope. *Science* 225:628-630.

EPSTEIN, N., MILLER, L. H., KAUSHEL, D. C., UDEINYA, I. C.,

RENER, J., HOWARD, R. J., ASOFSKY, R., AIKAWA, M., HESS, R. C. (1981). Monoclonal antibodies against a specific surface determinant on malaria (*Plasmodium knowlesi*) merozoite block erythrocyte invasion. *J. Immunol.* 127:212-217.

FANDEUR, T., DUBOIS, P., GYSIN, J., DEDET, J. P., PEREIRA da SILVA, L. (1984). In vitro and in vivo studies on protective and inhibitory antibodies against *Plasmodium falciparum* in the *Saimiri* monkey. *J. Immunol.* 132(1):432-437.

FREEMAN, R. R., HOLDER, A. A. (1983). Surface antigens of malaria merozoites: a high molecular weight precursor is processed to an 83.000 mol wt form expressed on the surface of *Plasmodium falciparum* merozoites. *J. Exp. Med.* 158:1647-1653.

GODSON, G. N., ELLIS, J., SVEC, J., SCHLESINGER, D. H. (1983). Identification and chemical synthesis of tandemly repeated immunogenic region of *Plasmodium knowlesi* circumsporozoite protein. *Nature* 305:29-33.

GOOD, M. F., BERZOFKY, J. A., MALOY, W. L., HAYASHI, Y., FUJII, N., HOCKEMEYER, W. T., MILLER, L. H. (1986). Genetic control of the immune response in mice to a *Plasmodium falciparum* sporozoite vaccine. *J. Exp. Med.* 164:655-660.

GRABAR, P., WILLIAMS, C. A. (1953). Methode permettant l'etude conjuguee des proprietes electrophoretiques et immunochimiques d'un melange de proteines. *Biochem. Biophys. Acta* 10:193-194.

HADLEY, T., AIKAWA, M., MILLER, L. H. (1983). *Plasmodium knowlesi*: studies on invasion of rhesus erythrocytes by merozoites in the presence of protease inhibitors. *Exp. Parasitol.* 55:306-311.

HALL, R., MCBRIDE, J., MORGAN, G., TAIT, A., ZOLG, J. W., WALLIKER, D., SCAIFE, J. (1983). Antigens of erythrocytic stages of the human malaria parasite, *Plasmodium falciparum*, detected by monoclonal antibodies. *Mol. Biochem. Parasitol.* 7:247-265.

HALL, R., HYDE, J. E., GOMAN, M., SIMMONS, D. L., HOPE, I. A., MACKAY, M., SCAIFE, J., MERKLI, B., RICHLE, R., STOCKER, J. (1984). Major surface antigen gene of human malaria parasite cloned and expressed in bacteria. *Nature* 311:379-382.

HEIDRICH, H.-G., STRYCH, W., MREMA, J. E. K. (1983). Identification of surface and internal antigens from spontaneously released *Plasmodium falciparum* merozoites by radioiodination and metabolic labelling. *Z. Parasitenkd.* 69:715-725.

HEIL, A., ZILLIG, W. (1970). Reconstitution of bacterial DNA-dependent RNA-polymerase from isolated subunits as a

tool for the elucidation of the role of the subunits in transcription. FEBS Letters 11(3):165.

HOLDER, A. A., FREEMAN, R. R. (1982). Biosynthesis and processing of a *Plasmodium falciparum* schizont antigen recognized by immune serum and monoclonal antibody. J. Exp. Med. 156:1528-1538.

HOLDER, A. A., FREEMAN, R. R. (1984). The major antigens on the surface of *Plasmodium falciparum* merozoites are derived from a single high molecular weight precursor. J. Exp. Med. 160:624-629.

HOLDER, A. A., LOCKYER, M. J., ODINK, K. G., SANDHU, J. S., RIVEROS-MORENO, V., NICHOLLS, S. C., HILLMAN, Y., DAVEY, L. S., TIZARD, M. L. V., SCHWARZ, R. T., FREEMAN, R. R. (1985). Primary structure of the precursor to the major surface antigens of *Plasmodium falciparum* merozoites. Nature 317:270-273.

HOWARD, R. F., STANLEY, H. A., CAMPBELL, G. H., LANGRETH, S. G., REESE, R. T. (1985). Two *Plasmodium falciparum* merozoite surface polypeptides share epitopes with a single Mr 185,000 parasite glycoprotein. Mol. Biochem. Parasitol. 17:61-77.

HUNKAPILLER, M. W., LUJAN, E., OSTRANDER, F., HOOD, L. E. (1983). Isolation of microgram quantities of proteins from polyacrylamide gels for amino acid sequence analysis. Meth. Enzymol. 91:227-236.

JENSEN, J. B. (1977). Concentration from continuous culture of erythrocytes infected with trophozoites and schizonts of *Plasmodium falciparum*. Am. J. Trop. Med. Hyg. 27:1274-1276.

KILEJIAN, A. (1979). Characterization of a protein correlated with the production of knob-like protrusions on membranes of erythrocytes infected with *Plasmodium falciparum*. Proc. Natl Acad. Sci. USA. 76:4650-4653.

KILEJIAN, A. (1980). Stage-specific proteins and glycoproteins of *Plasmodium falciparum*: identification of antigens unique to schizonts and merozoites. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 77(6):3695-3699.

LAEMMLI, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T₄. Nature 227:680-685.

LAMBROS, C., VANDERBERG, J. W. (1979). Synchronization of *Plasmodium falciparum* erythrocytic stages in culture. J. Parasitol. 65:418-420.

LAVERAN, A. (1880). Note sur un nouveau parasite trouve dans le sang de plusieurs malades atteints de fievre palustre. Bull. Acad. Med. Paris. 9:1235-1236.

MARSH, K., SHERWOOD, J. A., HOWARD, R. J. (1986). Parasite-infected-cell-agglutination and indirect immunofluorescence assay for detection of human serum antibodies bound to antigens on *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes. J. Immunol. Meth. 91:107-115.

MAZIER, D. S., MELLOUK, S., BEAUDOIN, R. L., TEXIER, B., DRUILHE, P., HOCKEMEYER, W., TROSPER, J., PAUL, C., CHAROENVIT, Y., YOUNG, J., MILTGEN, F., CHEDID, L., CHIGOT, J. P., GALLEY, B., BRANDICOURT, O., GENTILINI, M. (1986). Effect of antibodies to a recombinant and synthetic peptides on *P. falciparum* sporozoites in vitro. Science 231:156-159.

McBRIDE, J. S., NEWBOLD, C. I., ANAND, R. (1985). Polymorphism of a high molecular weight schizont antigen of the human malaria parasite *Plasmodium falciparum*. J. Exp. Med. 161:160-180.

McBRIDE, J. S., HEIDRICH, H.-G. (1987). Fragments of the polymorphic Mr 185.000 Glycoprotein from the surface of isolated *Plasmodium falciparum* merozoites from an antigenic complex. Mol. Biochem. Parasitol. 23(1):71-84.

McCUTCHAN, T. F., HANSEN, J. L., DAME, J. B., MULLINS, J. A. (1984). Mung bean nuclease cleaves *Plasmodium* genomic DNA at sites before and after genes. Science 225:625-628.

MREMA, J. E. K., LANGRETH, S. G., RIECKMANN, K. H., HEIDRICH, H.-G. (1982). *Plasmodium falciparum*: isolation and purification of spontaneously released merozoites by nylon sieves. Exp. Parasitol. 54:285-295.

NEWBOLD, C. I. (1984). Intraerythrocytic development and antigenicity of asexual malaria parasites. Mol. Biochem. Parasitol. 11:1-22.

NUSSENZWEIG, R. S., VANDERBERG, J., SPITALNY, G., RIVERA, I., ORTON, C., MOST, H. (1972b). Sporozoite induced immunity in mammalian malaria. Am. j. Trop. Med. Hyg. 21:722-728.

NUSSENZWEIG, V., NUSSENZWEIG, R. S. (1986). Development of a sporozoite vaccine. Am. J. Trop. Med. Hyg. 35(4):678-688.

ODINK, K. G., LOCKYER, M. J., NICHOLLS, S. C., HILLMAN, Y., FREEMAN, R. R., HOLDER, A. A. (1984). Expression of cloned cDNA for a major surface antigen of *Plasmodium falciparum* merozoites. FEBS Letters 173(1):108-112.

PASVOL, G., WILSON, R. J., SALLEY, M. E., BROWN, J. (1978). Separation of viable schizont-infected red blood cells of *Plasmodium falciparum* from human blood. Ann. Trop. Med. Parasitol. 72:87-88.

PERRIN, L. H., DAYAL, R., RIEDER, H. (1981). Characterization of antigens from erythrocytic stages of *Plasmodium falciparum* reacting with human immune sera. Trans. R. Soc.

Trop. Med. Hyg. 75:163-165.

PERRIN, L. H., DAYAL, R. (1982). Immunity to asexual erythrocytic stages of *Plasmodium falciparum*: role of defined antigens in the humoral response. Immunological Rev. 61:245-269.

PERRIN, L. H., MERKLI, B., GABRA, M. S., STOCKER, J. W., CHIZZOLINI, C., RIECHLE, R. (1985). Immunization with a *Plasmodium falciparum* merozoite surface antigen induces a partial immunity in monkeys. J. Clin. Invest. 75:1718-1721.

PIRSON, P. J., PERKINS, M. E. (1985). Characterization with monoclonal antibodies of a surface antigen of *Plasmodium falciparum* merozoites. J. Immunol. 134(3):1946-1951.

REESE, R. T., LANGRETH, S. G., TRAGER, W. (1979). Isolation of stages of the human parasite *Plasmodium falciparum* from culture and from animal blood. (1979). Bull. WHO 57:53-61.

REYNOLDS, J. A., TRAYER, H. (1971). Solubility of membrane proteins in aqueous media. J. Biol. Chem. 246(23):7337-7342.

RICHARDS, W. H. G., MITCHELL, G. H., BUTCHER, G. A., COHEN, S. (1977). Merozoite vaccination of rhesus monkeys against *Plasmodium knowlesi* malaria: immunity to sporozoite (mosquito-transmitted) challenge. Parasitology 74:191-198.

SHAMANSKY, L. M., LIM, H.-Y., HAGER, P., RISTIC, M. (1985). Purification and characterization of culture-derived exoantigens of *Plasmodium falciparum*. Mol. Biochem. Parasitol. 17:299-310.

SINDEN, R. E. (1984). The biology of *Plasmodium* in the mosquito. Experientia 40:1330-1342.

STANLEY, H. A., REESE, R. T. (1986). *Plasmodium falciparum* polypeptides associated with the infected erythrocyte plasma membrane. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 83:6093-6097.

THELU, J., AMBROISE-THOMAS, P., CHUMPITAZI, B., KUPKA, P. (1985). Purification and immunological study of *Plasmodium falciparum* exoantigens. J. Parasitol. 71(5):542-546.

TOGNA, A. R., DEL GUIDICE, G., VERDINI, A. S., BONELLI, F., PESSI, A., ENGERS, H. D., CORRADIN, G. (1986). Synthetic *Plasmodium falciparum* circumsporozoite peptides elicit heterogeneous L3T4⁺ T cell proliferative responses in H - 2^b mice. J. Immunol. 137(9):2956-2960.

TOWBIN, H., STAEGELIN, T., GORDON, J. (1979). Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 76(9):4350-4354.

TRAGER, W., JENSEN, J. D. (1976). Human malaria parasites in

continuous culture. Science 193:673-675.

TROYE-BLOMBERG, M., ROMERO, P., PATARROYO, M.-E., BJÖRKMAN, A., PERLMANN, P. (1984). Regulation of the immune response in *Plasmodium falciparum* malaria. III. Proliferative response to antigen in vitro and subset composition of T cells from patients with acute infection or from immune donors. J. Exp. Med. 58:380-387.

VERMEULEN, A. N., ROEFFEN, W. F. G., VAN MUNSTER, J. C., MEUWISSEN, J. H. E. Th. (1983). Isolation and characterization of membrane proteins of *Plasmodium berghei* sporozoites. Mol. Biochem. Parasitol. 7:197-207.

VERMEULEN, A. N., VAN DEURSEN, J., BRAKENHOFF, R. H., LENSEN, R. H., PONNUDURAI, T., MEUWISSEN, J. H. E. Th. (1986). Characterization of *Plasmodium falciparum* sexual stage antigens and biosynthesis in synchronized gametocyte cultures. Mol. Biochem. Parasitol. 20:155-163.

VERNES, A., HAYNES, J. D., TAPCHASRI, P., WILLIAMS, J. L., DUTOIT, E., DIGGS, C. L. (1984). *Plasmodium falciparum* strain-specific human antibody inhibits merozoite invasion of erythrocytes. Am. J. Trop. Med. Hyg. 33(2):197-203.

VERNOT-HERNANDEZ, J.-P., HEIDRICH, H.-G. (1985). The relationship to knobs of the 92.000 D protein specific for knobby strains of *Plasmodium falciparum*. Z. Parasitenkd. 71:41-51.

WEINBAUM, F. I., EVANS, C. B., TIGELAAR, R. E. (1976). Immunity to *Plasmodium berghei yoelii* in mice. I. The course of infection in T cell and B cell deficient mice. J. Immunol. 117:1999-2005.

WRAY, W., BOULIKAS, T., WRAY, V. P., HANCOCK, R. (1981). Silver staining of proteins in polyacrylamide gels. Anal. Biochem. 118:197-203.

WÄHLIN, B., WAHLGREN, M., PERLMANN, H., BERZINS, K., BJÖRKMANN, A., PATARROYO, M. E., PERLMANN, P. (1984). Human antibodies to a Mr 155.000 *Plasmodium falciparum* antigen efficiently inhibit merozoite invasion. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 81:7912-7916.

YAMAGA, K. M., KAN, S. C., KRAMER, K. J., SIDDIQUI, W. A. (1984). *Plasmodium falciparum*: comparative analysis of antigens from continuous in vitro cultured and in vivo derived malarial parasites. Exp. Parasitol. 58:138-146.

YOUNG, J. F., HOCKEMEYER, W. T., GROSS, M., BALLON, W. R., WIRTZ, R. A., TROSPER, J. H., BEAUDOIN, R. L., HOLLINGDALE, M. R., MILLER, L. H., DIGGS, C. L., ROSENBERG, M. (1985). Expression of *Plasmodium falciparum* circumsporozoite proteins in *Escherichia coli* for potential use in a human malaria vaccine. Science 228:958-962.

ZAVALA, F., TAM, J. F., HOLLINGDALE, M. R., COCHRANE, A. H., QUAKYI, I., NUSSENZWEIG, R. S., NUSSENZWEIG, V. (1985a). Rationale for development of a synthetic vaccine against *Plasmodium falciparum* malaria. *Science* 228:1436-1440.

ZAVALA, F., MASUDA, A., GRAVES, P. M., NUSSENZWEIG, V., NUSSENZWEIG, R. S. (1985b). Ubiquity of the repetitive epitope of the CS protein in different isolates of human malaria parasites. *J. Immunol.* 135:2790-2793.

Lebenslauf

Name	Arja Miettinen-Baumann, geb. Miettinen
Geburtstag	2. Dezember 1956
Geburtsort	Maaninka, Finnland
Staatsangehörigkeit	finnisch
Familienstand	verheiratet, seit 24. Juni 1982 mit Leonhard Baumann, München
Eltern	Inga Elina Miettinen, Aarne Vesa Miettinen
1963 - 1967	Besuch der Volksschule in Iso-Mervi und Pietarsaari, Finnland
1967 - 1975	Besuch des Gymnasiums in Pietarsaari
1975	Reifeprüfung
1976 - 1982	Studium der Biologie für das Diplom an der Ludwig-Maximilians-Universität, München
1982	Diplomprüfung
1983 - 1984	Diplomarbeit
Mai 1984 - Mai 1987	Doktorarbeit unter Anleitung von Herrn Dr. Heidrich am Max-Planck-Institut für Bio- chemie, Martinsried/München

